

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FAKULTA PŘÍRODOVĚDECKÁ  
KATEDRA BIOCHEMIE



*Disertační práce*

**Úloha systému oxidas se smíšenou funkcí s cytochromem P450  
v metabolismu léčiv a karcinogenů**

**The role of mixed function oxidases system with cytochrome  
P450 in metabolism of drugs and carcinogens**

*RNDr. Iveta Mrázová*

Vedoucí práce: *Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.*

Praha, 2016

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....  
RNDr. Iveta Mrízová

## **Prohlášení spoluautorů:**

Prohlašuji, že RNDr. Iveta Mrízová rozhodujícím způsobem (30-90%) přispěla ke vzniku všech 7 odborných publikací, které jsou přílohami této disertační práce. Sama provedla většinu experimentů a významně se podílela i na jejich plánování, na interpretaci výsledků a na sepsání publikací.

V Praze dne

.....  
prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za odborné vedení, věcné komentáře a rady, tak také za její podporu a věnovaný čas nejen při vypracování této práce.

Ráda bych také poděkovala doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi, Ph.D. za hmotnostní analýzy.

Můj velký dík také patří všem spolupracovníkům a studentům naší laboratoře za veškerou pomoc, rady a příjemné pracovní prostředí. Můj dík rovněž patří rodině za podporu při studiu.

*Práce byla podporována Grantovou agenturou České republiky (grant 14-18344S), Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (grant 1380214 a 640712) a Univerzitou Karlovou v Praze (UNCE 204025/20).*

# Abstrakt

Ellipticin (5,11-dimethyl-6*H*-pyrido[4,3-*b*]karbazol) je rostlinný alkaloid čeledi Apocynaceae, který vykazuje významnou protinádorovou a anti-HIV aktivitu. Jeden z mechanismů účinku tohoto protinádorového léčiva je, že se po enzymové aktivaci kovalentně váže na DNA a vytváří tak adukty s DNA. Enzymy, které se podílí na této aktivaci, patří mezi cytochromy P450 (CYP) a peroxidasy.

V disertační práci byl sledován vliv ellipticinu na expresi a aktivitu jednotlivých složek mikrosomálního monooxygenasového systému v různých tkáních laboratorního potkana. Současně byl sledován vliv ellipticinu a míra jeho cytotoxicity na různé nádorové buněčné linie. Součástí disertační práce byla i příprava anti-peptidové protilátky proti „orfánovému“ cytochromu P450 2S1, který je exprimován zejména v nádorových tkáních epiteliálního původu. Pro lepší poznání jak může CYP2S1 participovat na metabolismu cizorodých látek, byl tento protein připraven heterologní expresí v *E. coli* a byla analyzována jeho úloha v metabolismu ellipticinu, karcinogenního benzo[a]pyrenu (BaP) a jeho derivátu BaP-7,8-dihydrodiolu. Za využití myšího modelu byl studován vliv zánětu plic na metabolismus zmíněného environmentálního karcinogenu.

Výsledky získané v disertační práci plně prokazují, že ellipticin indukuje potkaní cytochromy CYP1A1/2, CYP3A a cytochrom *b*<sub>5</sub>, což má za následek zvýšení jejich enzymových aktivit a oxidaci ellipticinu jak na detoxifikační metabolity, tak i metabolity aktivační, které vedou ke vzniku aduktů s DNA. Navíc bylo zjištěno, že zvýšená exprese cytochromu *b*<sub>5</sub> může přispět k efektivnějšímu metabolismu ellipticinu, ale i dvou karcinogenů BaP a Sudanu I, a může tak modulovat jejich bioaktivaci zprostředkovanou cytochromy P450. Prokázáno bylo rovněž, že CYP2S1 participuje na oxidaci ellipticinu a BaP-7,8-dihydrodiolu bez účasti NADPH:cytochrom P450 reduktasy, s využitím organického peroxidu. Dále byla úspěšně připravena vysokoafinitní anti-peptidová protilátka proti CYP2S1, která může být užita jako diagnostický nástroj pro detekci markerů některých nádorových onemocnění, zejména jako prognostický marker pro karcinom pankreatu. Ve studii, která sledovala, jak může zánětlivé onemocnění plic ovlivnit metabolismus environmentálního karcinogenu benzo[a]pyrenu bylo prokázáno, že toto onemocnění může inhibovat enzymovou aktivitu CYP1A1, což vede k poškození DNA vznikem jeho aduktů s DNA v plicní tkáni.

# Abstract

Ellipticine (5,11-dimethyl-6*H*-pyrido[4,3-*b*]carbazole), an alkaloid isolated from Apocynaceae plants, exhibits significant antitumor and HIV activity. This antitumor agent binds to DNA and forms covalent DNA adducts. Enzymes, which are involved in its enzymatic activation, are cytochromes P450 (CYP) and peroxidases.

To elucidate the effect of ellipticine on the expression and enzymatic activity of the individual components of the microsomal mixed function oxidase system in different tissues, we used rat model. Simultaneously, the effect of ellipticine and its cytotoxicity on different tumor cell lines was also investigated. Another part of the presented work was targeted on preparation of anti-peptide antibody against orphan cytochrome P450 2S1, which is highly expressed in many human tumours of the epithelial origin, for its detection in these tissues. For better understanding how CYP2S1 can contribute to the metabolism of xenobiotics, the protein was prepared by heterologous expression in *E. coli*. Further, its role in metabolism of an antitumor drug ellipticine, a carcinogenic environmental pollutant benzo[*a*]pyrene (BaP) and its derivate BaP-7,8-dihydrodiol was examined. Utilizing a mouse model, the impact of pulmonary inflammation on the metabolism of an environmental carcinogen was investigated, too.

The results found in this thesis fully demonstrate the role of ellipticine in induction of rat cytochrome CYP1A1/2, CYP3A and cytochrome b<sub>5</sub>, resulting in an increase in CYP enzyme activities and oxidation of ellipticine to both its detoxification and activation metabolites forming DNA adducts. Moreover, an increased level of cytochrome b<sub>5</sub> may modulate the CYP-mediated bioactivation and detoxification of ellipticine as well as two carcinogens, BaP and Sudan I. It was also shown that CYP2S1 participates in the oxidation of ellipticine and BaP-7,8-dihydrodiol *via* the NADPH/POR-independent reaction using organic peroxide. The highly affinity anti-peptide antibody against CYP2S1 protein was successfully prepared and may be used as diagnostic tool for various cancers, in particular, as a prognostic marker for pancreatic cancer.

In the last part of the thesis, the effect of pulmonary inflammation on metabolism of an environmental carcinogen BaP was elucidated. Pulmonary inflammation may inhibit enzymatic activity of CYP1A1, which results in a decrease in pulmonary BaP detoxification, thereby enhancing BaP genotoxicity (DNA adduct formation) in the lung.

# Obsah

<b>1.</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>12</b>
<b>2.</b>	<b>TEORETICKÝ ÚVOD .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Nádorové procesy .....</b>	<b>17</b>
2.1.1	Mechanismus karcinogeneze.....	17
2.1.2	Chemické karcinogeny.....	19
2.1.3	Léčba nádorových onemocnění .....	21
2.1.4	Mechanismus účinku cytostatik.....	22
<b>2.2</b>	<b>Xenobiotika.....</b>	<b>23</b>
2.2.1	Benzo[a]pyren .....	23
2.2.1.1	Metabolismus BaP a tvorba aduktů s DNA .....	24
2.2.2	Ellipticin.....	26
2.2.2.1	Biotransformace ellipticinu a tvorba aduktů s DNA.....	27
2.2.3	Mezidruhové rozdíly v metabolismu karcinogenů a léčiv .....	31
<b>2.3</b>	<b>Biotransformace xenobiotik.....</b>	<b>32</b>
<b>2.4</b>	<b>Systém oxidas se smíšenou funkcí – MFO systém .....</b>	<b>34</b>
2.4.1	Cytochromy P450 .....	34
2.4.1.1	Struktura a enzymové funkce CYP .....	36
2.4.1.2	Mechanismus katalýzy CYP.....	37
2.4.1.3	Regulace exprese cytochromů P450.....	39
2.4.1.4	Cytochrom P450 2S1 .....	40
2.4.2	NADPH:cytochrom P450 reduktasa .....	42
2.4.3	Cytochrom b <sub>5</sub> .....	42
<b>3.</b>	<b>CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE .....</b>	<b>45</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>47</b>
<b>5.</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE.....</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b>Protinádorové léčivo ellipticin indukuje cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A, cytochrom b<sub>5</sub> a NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu v játrech, ledvinách a plicích potkana – publikace č. 1.....</b>	<b>52</b>
<b>5.2</b>	<b>Expresse enzymů metabolisujících protinádorové léčivo ellipticin, stanovené elektromigračními metodami, ovlivňují jeho cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám – srovnávací studie – publikace č. 2.....</b>	<b>59</b>

5.3	Protinádorové léčivo ellipticin aktivované cytochromy P450 způsobuje poškození DNA, které determinuje jeho farmakologické účinky v experimentálních modelech potkanů a myši s deletovanou cytochrom P450 reduktasou v játrech (HRN <sup>TM</sup> ) – publikace č. 3 .....	63
5.4	Zánět plic ovlivňuje tvorbu aduktů DNA s karcinogením benzo[a]pyrenem aktivovaným cytochromem P450 1A1 v tomto orgánu – publikace č. 4 .....	65
5.5	Příprava a využití antipeptidových protilátek pro detekci orfánových cytochromů P450 – publikace č. 5 .....	68
5.6	Indukce cytochromu b <sub>5</sub> působením ellipticinu, benzo[a]pyrenu a 1-fenylazo-2-naftolu (Sudanu I) v organismu potkana – publikace č. 6 .....	71
5.7	Heterologní exprese lidského cytochromu P450 2S1 v <i>Escherichia coli</i> a studium jeho úlohy v metabolismu benzo[a]pyrenu a ellipticinu – publikace č. 7. ....	75
6.	ZÁVĚR .....	79
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	81
8.	PŘÍLOHY .....	93



# Seznam použitých zkratek

<b>AH</b>	substrát cytochromů P450
<b>AMK</b>	aminokyselina
<b>AOH</b>	oxidovaná molekula substrátu
<b>AhR</b>	Ah receptor ( <i>aryl hydrocarbon receptor</i> )
<b>BaP</b>	benzo[a]pyren
<b>B-CPAP</b>	buňky papilárního karcinomu štítné žlázy
<b>BHT-101</b>	buňky papilárního karcinomu štítné žlázy
<b>BPDE</b>	benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid
<b>BT-474</b>	buňky prsního nádoru
<b>BxPC3</b>	pankreatické nádorové buňky
<b>CAR</b>	jaderný receptor ( <i>constitutive androstane receptor</i> )
<b>CCRF-CEM</b>	lidské leukemické T-buňky
<b>CEC</b>	3-cyano-7-ethoxykumarin
<b>CO</b>	oxid uhelnatý
<b>COX-1/2</b>	cyklooxygenasa-1/2 (prostaglandin H synthasa 1/2)
<b>CPR</b>	NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa
<b>CYP</b>	cytochrom P450
<b>cyt b<sub>5</sub></b>	cytochrom b <sub>5</sub>
<b>C57B16</b>	myší kmen
<b>Da</b>	dalton
<b>dG-N<sup>2</sup>-BPDE</b>	N <sup>2</sup> -(10-(7,8,9-trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydro-benzo[a]pyren)-yl)-deoxyguanosin
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b><i>E. coli</i> DH5α</b>	kmen <i>Escherichia coli</i>
<b>ELISA</b>	enzymová imunoanalýza („ <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> “)
<b>EMEM</b>	Eagle's Minimum Essentials Medium
<b>ER</b>	endoplasmatické retikulum

<b>EROD</b>	ethoxyresorufin- <i>O</i> -deethylace
<b>FAA</b>	2-acetylaminofluorenu
<b>FAD</b>	flavinadenindinukleotid
<b>FMN</b>	flavinmononukleotid
<b>FITC</b>	fluoresceinisothiokyanat
<b>GAPDH</b>	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
<b>HCT116</b>	buňky kolorektálního karcinomu
<b>HeLa</b>	nádorové buňky děložního čípku
<b>HL-60</b>	lidské leukemické buňky
<b>HPLC</b>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
<b>HRN</b>	myší linie „ <i>hepatic reductase null</i> “
<b>HRP</b>	peroxidasa křenu selského
<b>IARC</b>	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny („ <i>International Agency for Research on Cancer</i> “)
<b>IC<sub>50</sub></b>	koncentrace sloučeniny, při které je dosaženo 50% maximálního buněčného poškození ( <i>half maximal inhibition concentration</i> )
<b>IMDM</b>	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
<b>i.p.</b>	intraperitoneálně (do dutiny břišní)
<b>KLH</b>	hemocyaninový proteinový nosič ( <i>keyhole limpet hemocyanin</i> )
<b>LPO</b>	laktoperoxidasa
<b>LPS</b>	lipopolysacharid
<b>MALDI-TOF</b>	„ <i>Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight</i> “
<b>MCF-7</b>	buňky prsního adenokarcinomu
<b>MFO</b>	system monooxygenas se smíšenou funkcí ( <i>mixed function oxidases</i> )
<b>MiaPaCa</b>	pankreatické nádorové buňky
<b>MPO</b>	myeloperoxidasa
<b>mRNA</b>	messenger RNA
<b>MROD</b>	methoxyresorufin- <i>O</i> -demethylace
<b>MTT</b>	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid
<b>NADH</b>	nikotinamidadenindinukleotid (redukovaný)
<b>NADP<sup>+</sup></b>	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaný)
<b>NADPH</b>	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný)

<b>NER</b>	oprava DNA „vyříznutím“ nukleotidu ( <i>nucleotide excision repair</i> )
<b>Ni-NTA</b>	nikl-nitrilotrioctová kyselina
<b>NQO1</b>	NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa
<b>PAH</b>	polycyklický aromatický uhlovodík ( <i>polycyclic aromatic hydrocarbon</i> )
<b>p.o.</b>	per os (ústy)
<b>PPAR</b>	jaderný receptor ( <i>peroxisome proliferator activated receptor</i> )
<b>PXR</b>	pregnane X receptor
<b>RAL</b>	relativní množství aduktů (podíl modifikovaných nukleotidů z celkového počtu nukleotidů) „ <i>relative adduct labeling</i> “
<b>RH</b>	substrát monooxygenasové reakce
<b>RNA</b>	ribonukleová kyselina
<b>ROH</b>	hydroxylovaný produkt monooxygenasové reakce
<b>R'OH</b>	alkohol vzniklý redukcí hydroperoxidu
<b>R'OOH</b>	organický peroxid
<b>ROS</b>	reaktivní formy kyslíku ( <i>reactive oxygen species</i> )
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute medium
<b>RT-PCR</b>	reverzní transkripce polymerázové řetězové reakce ( <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> )
<b>Sudan I</b>	1-fenylazo-2-naftol
<b>TLC</b>	chromatografie na tené vrstvě
<b>UKF-NB-3/4</b>	buňky neuroblastomu
<b>U87MG</b>	buňky glioblastomu
<b>TPO</b>	thyroid peroxidasa
<b>ZR-75-30</b>	buňky prsního nádoru
<b>WT</b>	„divoký“ kmen ( <i>wild type</i> )
<b>8505-C</b>	buněčné linie anaplastického karcinomu štítné žlázy

# **1. Úvod**

Tato disertační práce vznikla na katedře biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Práce je založena na výsledcích publikovaných v sedmi publikacích, které jsou uvedeny jako *přílohy 1-7*:

1. **Iveta Vranová**, Michaela Moserová, Petr Hodek, René Kizek, Eva Frei, Marie Stiborová: The anticancer drug ellipticine induces cytochromes P450 1A1, 1A2 and 3A, cytochrome b<sub>5</sub> and NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase in rat liver, kidney and lung. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 8 (**2013**) 1586 – 1597. IF<sub>2013</sub> = 1.956
2. Marie Stiborová, Jitka Poljaková, **Iveta Mrízová**, Lucie Bořek-Dohalská, Tomáš Eckschlager, Vojtěch Adam, René Kizek, Eva Frei: Expression levels of enzymes metabolizing an anticancer drug ellipticine determined by electromigration assays influence its cytotoxicity to cancer cells - a comparative study. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 9 (**2014**) 5675 – 5689. IF<sub>2014</sub> = 1.500
3. Marie Stiborová, Věra Černá, Michaela Moserová, **Iveta Mrízová**, Volker M. Arlt, Eva Frei: The anticancer drug ellipticine activated with cytochrome P450 mediates DNA damage determining its pharmacological efficiencies: studies with rats, hepatic cytochrome P450 reductase null (HRN<sup>TM</sup>) mice and pure enzymes. *Int. J. Mol. Sci.*, 16 (**2015**) 284-306. IF<sub>2014</sub> = 2.862
4. Volker M. Arlt, Annette M. Kraiss, Roger W. Godschalk, Yanira Riffo-Vasquez, **Iveta Mrízová**, Candice A. Roufosse, Charmaine Corbin, Shi Quan, Eva Frei, Marie Stiborová, Frederik-Jan van Schooten, David H. Phillips, and Domenico Spina: Pulmonary inflammation impacts on CYP1A1-mediated respiratory tract DNA damage induced by the carcinogenic air pollutant benzo[a]pyrene. *Tox. Sci.*, 146 (**2015**) 213-225. IF<sub>2014</sub> = 3.854
5. Petr Hodek, Johana Hrdinová, Iva Mácová, Pavel Souček, **Iveta Mrízová**, Kamila Burdová, René Kizek, Jiří Hudeček, Marie Stiborová: Preparation and application of anti-peptide antibodies for detection of orphan cytochromes P450. *Neuro Endocrinol. Lett.*, 36 (Suppl. 1) (**2015**) 101-108. IF<sub>2014</sub> = 0.799

6. Marie Stiborová, Michaela Moserová, **Iveta Mrízová**, Helena Dračínská, Václav Martínek, Radek Indra, Eva Frei, Vojtěch Adam, René Kizek, Heinz H. Schmeiser, Kateřina Kubáčková, Volker M. Arlt: Induced expression of microsomal cytochrome b<sub>5</sub> determined at mRNA and protein levels in rats exposed to ellipticine, benzo[a]pyrene, and 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I). *Monatsh. Chem.*, 147 (**2016**) 897-904. IF<sub>2014</sub> = 1.222
  
7. **Iveta Mrízová**, Michaela Moserová, Jan Milichovský, Miroslav Šulc, René Kizek, Kateřina Kubáčková, Volker M. Arlt, Marie Stiborová: Heterologous expression of human cytochrome P450 2S1 in *Escherichia coli* and investigation of its role in metabolism of benzo[a]pyrene and ellipticine. *Monatsh. Chem.*, 147 (**2016**) 881–888. IF<sub>2014</sub> = 1.222

Předkládaná disertační práce je součástí výzkumu laboratoře prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc., který se zabývá studiem systému oxidas se smíšenou funkcí (angl. mixed function oxidase systém, MFO) v metabolismu cizorodých látek. V disertační práci jsem se konkrétně zabývala studiem cytochromů P450 a dalších složek MFO systému, které participují na biotransformačních reakcích karcinogenů (benzo[a]pyren) a nádorových léčiv (ellipticin).

Xenobiotikum (z řeckého *xenos* - cizí, *bios* - život), je cizorodá sloučenina, která se v organismu normálně nevyskytuje (léčiva, jedy, průmyslové chemikálie) a je po metabolismu primárně vylučována z těla ven. Ve většině případů dochází při těchto reakcích ke snížení toxicity xenobiotika a takové reakce označujeme jako detoxikační. V některých případech, ale může naopak při reakcích dojít ke zvýšení toxického účinku xenobiotika – aktivaci. Jedny z nejdůležitějších enzymů metabolisujících xenobiotika jsou mikrosomální monooxygenasy (oxidasy) se smíšenou funkcí (MFO, z angl. „mixed function oxidases“), v nichž jako terminální oxidasa funguje právě hemový enzym cytochrom P450.

Benzo[a]pyren (BaP) je jednou z hlavních složek cigaretového kouře a je označován za jednoho z nejvýznamnějších původců vzniku rakoviny plic u kuřáků. BaP je po vstupu do organismu metabolisovaný a některé jeho metabolity reagují s DNA za vzniku aduktů. Metabolická aktivace je katalyzovaná právě cytochromy P450 a nedostatečné odstranění těchto aduktů s DNA může vést až k iniciaci tvorby nádoru. Naproti tomu ellipticin vykazuje významnou protinádorovou aktivitu (využíván při léčbě karcinomu prsu, akutní myeloblastické leukémii nebo karcinomu štítné žlázy). Biotransformací této sloučeniny vznikají účinnější metabolity, které poškozují nádor ještě efektivněji. Enzymy, které se podílejí na biotransformaci ellipticinu jsou cytochromy P450 a peroxidasy.

Z výše popsaných důvodů je proto potřeba znát mechanismus, kterým jednotlivé enzymy při aktivaci a/nebo deaktivaci těchto látek působí. Předkládaná disertační práce přináší ucelené poznatky o tom, jaké enzymy, a za jakých podmínek, katalyzují aktivační a detoxikační reakce ellipticinu a BaP v organismech potkana a myši a v lidských nádorových buněčných liniích. Pro detailní popsání úlohy MFO v metabolismu ellipticinu a BaP byl heterologní expresí v *E. coli* rovněž připraven tzv. „orfánový“ cytochrom P450 2S1. Purifikovaný enzym byl použit pro zjištění schopnosti oxidovat karcinogenní BaP, jeho derivát benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol a protinádorové léčivo ellipticin.

## **2. Teoretický úvod**



## 2.1 Nádorové procesy

**Karcinogeneze** je mnohastupňový proces, při němž dochází k nahromadění poruch neboli mutací určitých genů a porušení normální funkce jimi kódovaných proteinů. Tyto proteiny se podílejí zejména na regulaci dělení a diferenciaci buňky. Nejzávažnější jsou poruchy genů pro proteiny, které se podílejí na přenosu signálů, kontrole exprese genů, kontrole správnosti replikace DNA a chromosomů, regulaci buněčného cyklu, dělení a diferenciaci buněk nebo apoptózy poškozených nebo nesprávně diferencovaných buněk (Stratil a Kubáň, 2004).

Mutace mohou být definovány jako změny v nukleotidové sekvenci DNA. Ty mohou nastat v důsledku poškození DNA nebo inkorporací nekomplementárních nukleotidů v procesu syntézy DNA. Na procesu karcinogeneze se podílí více faktorů, které je možné rozdělit na **vnější** a **vnitřní**. Vnější faktory můžeme dále, dle povahy, dělit na **fyzikální** (UV), **chemické** (složky tabákového kouře, aflatoxiny, atd.) a **biologické** (viry, bakterie). Mezi vnitřní faktory, které se podílí na mutacích genů, a které vedou k nádorovému bujení, patří tvorba reaktivních forem kyslíku a dusíku, alkylace, depurinace a deaminace cytidinu (Loeb, 1989; Wogan, 2004). Vznik a vývoj nádoru je podmíněný zvýšenou genovou nestabilitou z důvodu vad v opravě DNA a dalších faktorech. Heterogenní povaha lidských nádorů odráží různorodost v genech, které jsou mutované a/nebo abnormálně exprimované. Individuální rozdíly v procesu tvorby nádoru jsou ovlivněny dědičnými rozdíly v enzymech, které aktivují nebo deaktivují možné karcinogeny, v účinnosti systémů opravujících poškozenou DNA a dalších. Věk, pohlaví a stravovací návyky mohou taky zvýšit riziko rakoviny v určitých orgánech. Proto je proces tvorby nádoru často výsledkem komplexního působení mezi těmito faktory (Khambete a Kumar, 2014).

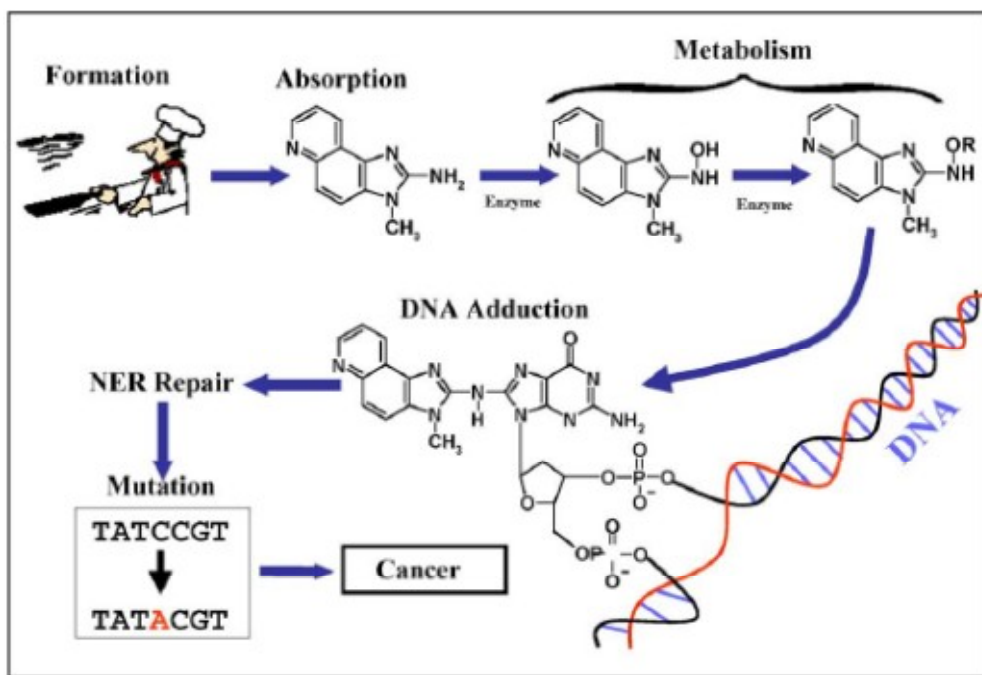
V procesu karcinogeneze může vznikat **benigní** nebo **maligní** nádor. Benigní nádor není rakovinný, ve většině případů je odstraněn a nedochází k návratu jeho tvorby. Naproti tomu maligní nádor neboli zhoubný nádor je velmi agresivní a je doprovázen vznikem metastáz. To znamená, že se může šířit dál v organismu a ničit tak okolní tkáň.

### 2.1.1 Mechanismus karcinogeneze

Nedávné studie ukazují, že několikastupňový proces karcinogeneze je výsledkem mutací v tzv. **onkogenech** a **tumor supresorových genech** (Weinberg, 1995; Weinstein, 1988). Onkogeny jsou geny kódující proteiny pozitivně regulující normální růst buňky,

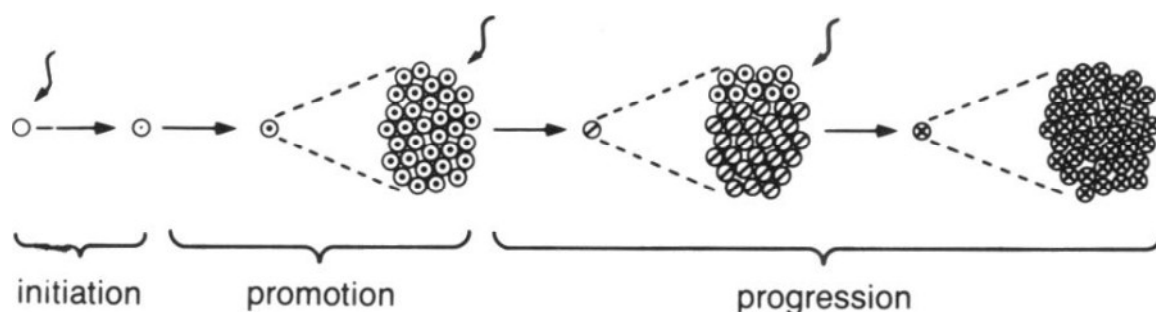
jejichž poruchy vedou ke ztrátě růstové kontroly a přeměně normální buňky v nádorovou. Podle funkce lze onkogeny dělit na *i)* geny pro růstové faktory, *ii)* geny pro receptory růstových faktorů a hormonů, *iii)* geny pro převaděče signálů, *iv)* geny pro transkripční faktory (Pierotti, 2003). Produkty onkogenů tedy zasahují do všech čtyř obecných funkcí kontroly buněčného růstu. Tumorové supresorové geny (tumor supresorové geny) hrají důležitou regulační úlohou v buněčné proliferaci, diferenciaci a jiných buněčných a systémových procesech, jejichž inaktivace má onkogenní účinky (Stiborová, 2002a). Je také zřejmé, že epigenetické abnormality v expresi těchto genů hrají rovněž důležitou roli v karcinogenezi. Doposud bylo identifikováno více než 100 onkogenů a nejméně 12 tumor supresorových genů (Schwab, 2004; Stiborová, 2002a; Lodish, 2000; Cooper, 2000).

Z hlediska karcinogeneze je nejzávažnější modifikací DNA považována tvorba kovalentních aduktů (*kapitola 2.1.2*). Více než 90 % sloučenin prokázaných jako karcinogeny pro člověka totiž iniciuje nádorové procesy právě kovalentními vazbami na DNA (Stiborová, 1998). Ačkoliv je většina aduktů z DNA eliminována opravnými mechanismy, některé adukty způsobují perzistentní mutace ve výše uvedených genech kontrolujících růst a diferenciaci buněk (*Obrázek 1*). Výsledkem je pozměněný buněčný vývoj a nádorové procesy (Bishop, 1991).



**Obrázek 1:** Komplexní proces od vzniku karcinogenu až po nádorové bujení (Wogan 2004).

Proces chemické karcinogeneze může být rozdělen do 3 fází – **iniciace**, **promoce**, **progrese** (Obrázek 2) (Barrett, 1987; Devi, 1998; Weinstein, 1988; Oliveira et al., 2007; Irigaray et al., 2010). V **iniciační fázi** dochází ke změně genetické informace normální buňky, vzniku mutace. V této fázi může dojít k reparaci poškozené DNA opravnými systémy a buňka tak může pokračovat v normálním růstu nebo dojde k její programové smrti, apoptóze. Pokud nedojde k opravě, buňka může setrvat v iniciační fázi několik týdnů až roků (latence). Pokud iniciovanou buňku nezlikviduje ani imunitní systém, může se v dalších stádiích vyvinout až v nádor. V **promoční fázi** dochází ke zvýšené proliferaci a může trvat až desítky let. Látky, které upevňují mutace, způsobující změny v regulaci buněčného cyklu, se nazývají promotory. Při jejich metabolismu často dochází ke vzniku aktivních forem kyslíku, které mohou vyvolat oxidační změny v DNA a tak aktivovat protoonkogeny. Častým mechanismem účinku promotorů je rovněž aktivace proteinkinasy c (Scott, 1984; Stiborová a Mikšanová, 1999a). Karcinogenní látky kromě cílové buňky působí také na její nejbližší okolí a tím vytváří ještě lepší podmínky pro proliferaci pozměněné buňky. Poslední stupeň vývoje nádoru je **progrese**. V tomto stádiu se benigní nádor mění v maligní. Nádorové buňky se šíří krevním řečištěm do ostatních tkání a vznikají metastázy. Tento stupeň je ireverzibilní.



**Obrázek 2:** Tři fáze chemické karcinogeneze (Barrett, 1987).

### 2.1.2 Chemické karcinogeny

V průběhu třicátých let 20. století byl zaznamenán nárůst v identifikaci karcinogenních sloučenin a jejich vlastností, který následně vedl ke snaze odstranit tyto sloučeniny z výroby a užívání v průmyslu. Rakovina močového měchýře byla běžná u pracovníků ve výrobě barviv a kaučuku (2-naftylamin), zatímco rakovina plic byla spojena s průmyslem chromu. Pozornost byla také zaměřena na chemické sloučeniny, které se vyskytovaly v potravinách, nápojích nebo lécích. Nicméně bylo zjištěno, že

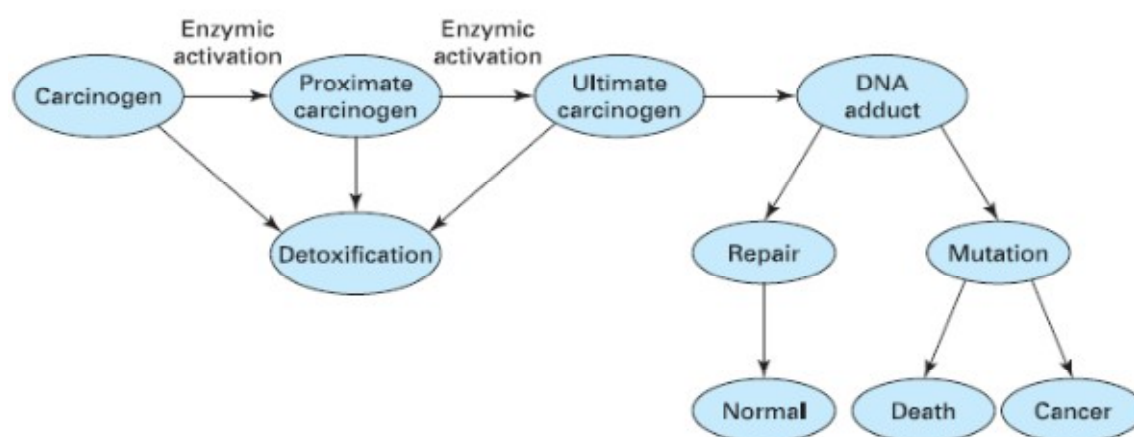
průmyslové výrobky a potravinářská aditiva představují méně než 2 % z příčin vzniku nádorů. I když výsledky a zjištění z této oblasti výzkumu měly jenom malý dopad na snížení incidence rakoviny v lidské populaci, chemická karcinogeneze se stala důležitým tématem, protože objasňuje cesty a způsoby, kterými chemické látky způsobují změny normální funkce buněk. V současnosti se trend výzkumu zaměřuje na identifikaci mutací, ze kterých by bylo možné charakterizovat chemickou povahu původce místo toho, aby byly definované konkrétní karcinogenní látky (Loeb a Harris, 2008; King a Robins, 2006).

Podle mezinárodní organizace pro výzkum rakoviny (IARC) patří mezi prokazatelné karcinogeny pro člověka 118 sloučenin (skupina 1) a 363 sloučenin se řadí mezi potenciální karcinogeny vyvolávající nádorová onemocnění v lidském organismu (skupina 2A a 2B) (IARC 2012; Coglian et al., 2011). Některé z těchto sloučenin nebo jejich metabolity, tvoří kovalentní adukty s DNA (genotoxické karcinogeny). Ostatní působí na epigenetické úrovni změnou dráhy přenosu signálu a genové exprese. Mezi ně patří nádorové promotory, růstové faktory a specifické hormony (Irigaray et al., 2010).

Sloučeniny, které tvoří kovalentní adukty s DNA, můžeme rozdělit do 4 kategorií: polycyklické aromatické uhlovodíky (např. benzo[a]pyren), aromatické amíny (např. 2-naftylamin) nitrosamíny (např. *N*-nitrosodimethylamin) a alkylační činidla (např. 2,2-dichloro-diethylsulfid). Společným znakem všech těchto sloučenin je, že mají elektrofilní skupiny nebo skupiny, které mohou být na takové metabolicky přeměněny. Tyto skupiny tvoří kovalentní vazby s nukleofily, jako je amino skupina, sulfhydrylová nebo hydroxylová skupina druhé molekuly. Takové nukleofilní skupiny jsou přítomny v proteinech, RNA a DNA. Ačkoli interakce mezi karcinogenem s každou z těchto makromolekul byly identifikovány, adukty s DNA jsou ty, které se vznikem rakoviny souvisí nejvíce. Během syntézy DNA dochází k oddělení dvou vláken a DNA je zvláště citlivá na atak karcinogenní sloučeniny. Vznik aduktu narušuje strukturu DNA a tím i replikaci. Za normálních okolností může být tato „chyba“ opravena, pokud tomu tak není, je pak takto pozměněná báze DNA zavedena do nově vznikajícího vlákna DNA (mutace). Různé karcinogeny tvoří odlišné adukty, které zase vytvářejí různé mutace (King a Robins, 2006; Oliveira et al., 2007; Garner, 1998; Poirier et al. 2000, 2004).

Většina exogenních chemických karcinogenních sloučenin není aktivní ve své přirozené formě (např. BaP). V tkáních jsou přeměňovány oxidačními enzymy, zejména mikrosomálními cytochromy P450 (*kapitola 2.4.1*). Nejdříve je karcinogen přeměněn na tzv. **proximální** (benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol) a pak na **ultimativní** (benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide). Ultimativní karcinogen pak reaguje s DNA (*Obrázek 3*).

Na odstraňování oxidovaných forem karcinogenů se podílejí mnohé transferasy, např. glutathion-*S*-transferasy, UDP-glukuronosyltransferasy a sulfotransferasy. Nicméně se na detoxikaci karcinogenů také podílí samotné cytochromy P450. U některých enzymů existuje genetická variabilita, meziorgánová variabilita, polymorfismus a etnická specifita. To má za následek např. specifické působení některých karcinogenních látek jen na určitý orgán nebo tkáň, různou odolnost jedinců nebo určitých etnických skupin ke karcinogennímu působení určitých sloučenin. Jako příklad může posloužit polymorfismus cytochromu P450 2D6 u rakoviny plic. U lidí s polymorfismem CYP2D6 nemusí dojít k aktivaci karcinogenních složek tabákového kouře a tedy pravděpodobnost vzniku rakoviny plic je menší. Epidemiologické průzkumy podporují toto tvrzení, nicméně takto prospěšný polymorfismus je vzácný a má proto malý dopad v populaci (Stratil a Kubáň 2004; Wogan, 2004; King a Robins, 2006).



**Obrázek 3:** Přeměna karcinogenní látky na adukt s DNA a důsledky tohoto procesu (King a Robins, 2006).

### 2.1.3 Léčba nádorových onemocnění

Léčba nádorových onemocnění se zaměřuje na vlastní vyléčení, prodloužení života a zlepšení kvality života pacientů. Ve většině případů musí být použita komplexní léčba, která kombinuje několik metod: chirurgickou léčbu, **chemoterapii**, radioterapii a imunoterapii.

Již z názvu chemoterapie je patrné, že tato terapie je založená na užívání chemických látek, **cytostatik**. Podstatou protinádorového účinku chemoterapie je inhibice buněčné proliferace, nebo stimulace apoptózy. Nicméně většina cytostatik nerozlišuje nádorovou a zdravou buňku. Proto při léčbě cytostatiky kromě toxického účinku na nádorovou buňku

dochází k poškození zdravé tkáně. Cílem je tyto vedlejší účinky maximálně omezit a co nejvíce snížit počet nádorových buněk nebo je zcela odstranit

#### 2.1.4 Mechanismus účinku cytostatik

Cytostatika jsou látky, které působí různými mechanismy a na různé struktury v nádorové buňce, zejména na ty, které jsou nutné pro přežití buňky. Je to hlavně DNA nebo mitotické vřeténko, které jsou esenciální pro dělení buňky. Účinkem cytostatik dochází k zastavení růstu maligních buněk nebo k programové smrti – apoptóze. Cytostatika nejsou specifická, proto kromě rychle se dělících nádorových buněk působí i na zdravé buňky, které se dělí. Mechanismy účinku cytostatik jsou:

- **Poškození mitotického vřeténka** – inhibice polymerace tubulinových podjednotek na mikrotubuly, které mají funkci v metafázi buněčného dělení. Patří sem tzv. mitotické jedy (vinkristin, vinblastin), nebo inhibice destrukce mikrotubulů (paklitaxel, docetaxel).
- **Poškození struktury a funkce nukleových kyselin** – prostřednictvím alkylace (mechloretoamin a jeho analog chlorambucil), interkalace (doxorubicin), štěpení DNA (epipodofylotoxiny) nebo inhibice topoisomeras (tekany), což má za následek nesprávné čtení genetické informace a z toho vyplývající nesprávná replikace a transkripce.
- **Porucha syntézy DNA a RNA inhibicí enzymů jejich metabolismu** – pomocí tzv. antimetabolitů (strukturně podobné metabolitům), dochází k inhibici syntézy DNA a RNA (analog kyseliny listové – methotrexát), a/nebo po svém zabudování do vlákna vznikají „falešné“ nukleové kyseliny.
- **Inhibice proteosyntézy** – působí pomocí enzymu L-asparaginázy štěpícího asparagin.
- **Poškození buněčné membrány** (Klener 1996, 2002; Stiborová, 2011a).

Cytostatika kromě toho, že nerozeznají zdravou dělící se buňku od nádorové, způsobují nezvratné změny v genetické informaci „normálních“ buněk a mají toxický účinek na důležité orgány – játra, ledviny, plíce, srdce.

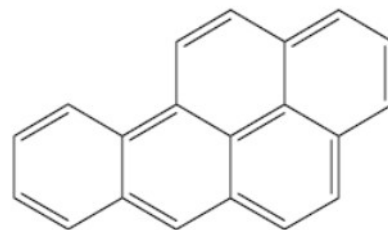
## 2.2 Xenobiotika

Jako xenobiotika (xenos-cizí) se označují látky, které se v organismu normálně nevyskytují a nejsou nutné pro jeho zdravý vývoj a ani pro něho neslouží jako zdroj energie (Knejzlík et al., 2000). Primárním zdrojem xenobiotik je nejčastěji chemický průmysl, zatímco jako sekundární zdroj se označují ty oblasti lidské činnosti, kde jsou tyto produkty používány (léčivá, drogy, potravinářská aditiva, plasty, pesticidy, atd.). Je nutné si uvědomit, že riziko poškození organismu je závislé kromě toxicity látky, i na její koncentraci a době působení. Během evoluce se u jednotlivých organismů vyvinulo mnoho detoxikačních mechanismů, které jsou důležité pro odstranění cizorodé sloučeniny a pro zachování organismu (*kapitola 2.3*).

Poznání metabolismu xenobiotik v lidském organismu tedy také potenciálně umožňuje např. zvyšovat nebo modulovat účinek léčiv nebo naopak snižovat jejich vedlejší účinky, umožňuje ale i omezovat rizika vznikající při expozici lidské populace potenciálně toxickým a karcinogenním látkám. Jedny z nejdůležitějších enzymů metabolisujících xenobiotika jsou mikrosomální monooxygenasy (oxidasy) se smíšenou funkcí (MFO, z angl. „mixed function oxidases“), v nichž jako terminální oxidasa funguje právě hemový enzym cytochrom P450 (Knejzlík et al., 2000; Stiborová et al., 1999b).

### 2.2.1 Benzo[a]pyren

Benzo[a]pyren (BaP) patří mezi polycyklické aromatické uhlovodíky (angl. polycyclic aromatic hydrocarbon tj. PAH) (*Obrázek 4*). Je to světle žlutá pevná krystalická látka a je nerozpustná ve vodě. BaP se uvolňuje do ovzduší z přírodních (požáry lesů) a zejména z antropogenních zdrojů a odstraňován je za pomoci fotochemických oxidací – reakce s oxidy dusíku, hydroxy- a hydroperoxy-radikály nebo ozonem. Do životního prostředí se dostává v důsledku nedokonalého spalování dřeva a uhlí, výfukovými plyny motorových vozidel, cigaret a různých průmyslových spalovacích procesů. BaP byl také nalezen v sazích a dehtu (IARC, 2012; U.S.EPA, 2013).

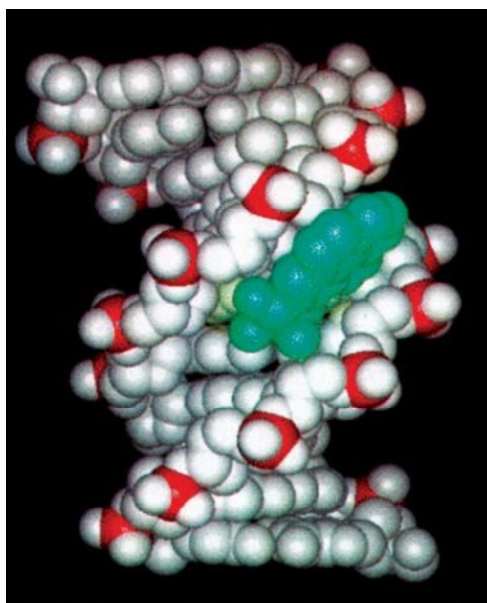


**Obrázek 4:** Struktura benzo[a]pyrenu.

BaP je jednou z hlavních složek cigaretového kouře (Phillips 1999, 2002), a je proto označován za jednoho z nejvýznamnějších původců vzniku rakoviny plic u kuřáků. (Cornfield et al., 2009). BaP vykazuje cytotoxické, teratogenní, genotoxické, mutagenní a karcinogenní vlastnosti v různých tkáních, v buněčných liniích a orgánech včetně plic a kůže a je prokázaným karcinogenem pro člověka a hlodavce (IARC skupina 1) (Nebert, 1989a; Ellard et al., 1991; Hecht, 2002; IARC, 2012). BaP je po vstupu do organismu metabolisovaný a jeho polárnější metabolity reagují s DNA za vzniku aduktů (Lemieux et al., 2011; Luch a Baird, 2005). Metabolická aktivace je katalyzovaná cytochromy P450 za vzniku vysoce reaktivních diol-epoxidů, které se kovalentně vážou na nukleofilní skupinu deoxyguaninu v poloze N<sup>2</sup> (Phillips, 2005; Arlt et al., 2012). Nedostatečné odstranění těchto aduktů s DNA před replikací může vést až k deaktivaci tumor supresorových genů nebo aktivaci onkogenů což vede k iniciaci nádoru (Baird et al., 2005).

### 2.2.1.1 Metabolismus BaP a tvorba aduktů s DNA

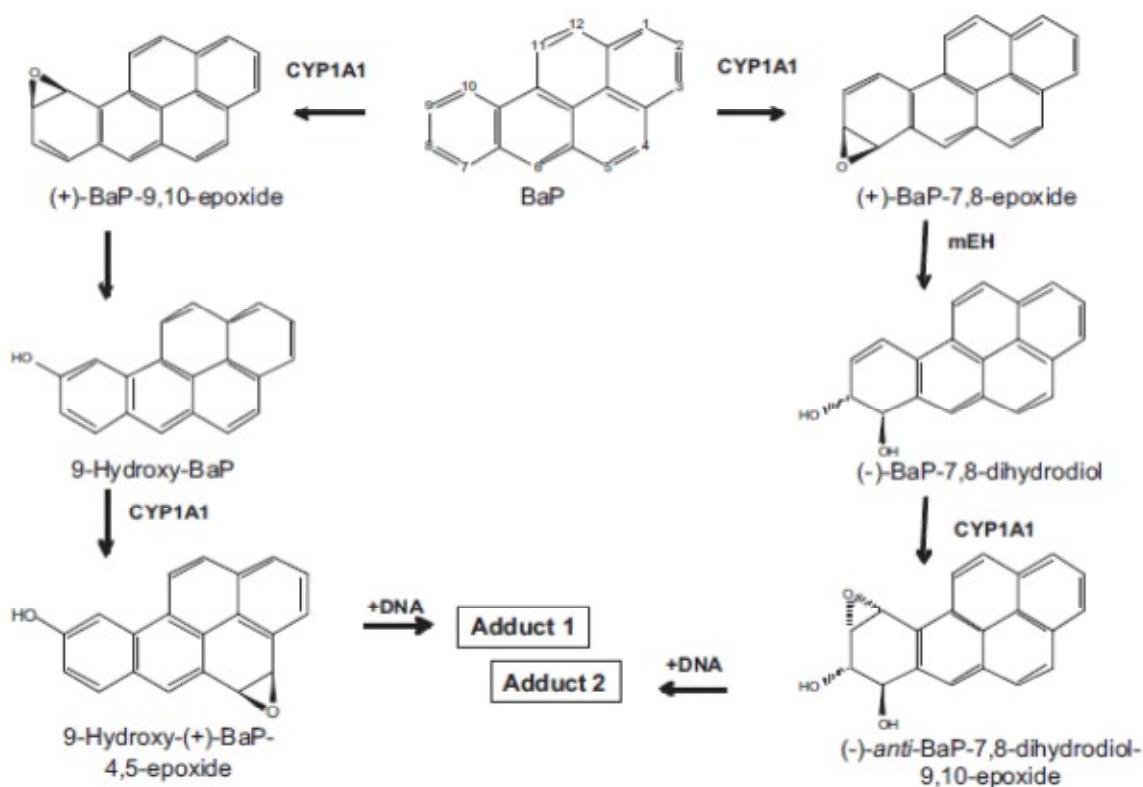
Cytochromy P450 v kombinaci s epoxidhydrolasou jsou hlavní biotransformační enzymy, které participují na aktivaci BaP na reaktivní metabolit BaP-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE), který vytváří kovalentní adukty s DNA v experimentech *in vivo* i *in vitro* (Phillips, 2005) (Obrázek 5).



**Obrázek 5:** Struktura (7R)-N<sup>2</sup>-(10-(7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydro-benzo[a]pyren)-yl)-deoxyguanosin (BPdG), který vzniká vazbou 7 $\beta$ ,8 $\alpha$ -dihydroxy-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -epoxy-7,8,9,10-tetrahydro-benzo[a]pyren (BPDE; zelená molekula) na deoxyguanosin (Geacintov et al., 1997; Poirier, 2004).



V prvním kroku je benzo[a]pyren oxidován cytochromy P450 1A1 a 1B1 na benzo[a]pyren-7,8-epoxid, který je pak přeměněn epoxidhydrolasou na 7,8-dihydroxybenzo[a]pyren (Baird et al., 2005; Luch a Baird, 2005). V dalším kroku vzniká za pomoci CYP1A1/1B1 ultimativní karcinogen benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE), který reaguje s DNA za vzniku (7R)-N<sup>2</sup>-(10-(7β,8α,9α-trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydro-benzo[a]pyren)-yl)-deoxyguanosinu (dG-N<sup>2</sup>-BPDE), hlavního aduktu s DNA (Obrázek 6).



**Obrázek 6:** Biotransformace BaP a tvorba aduktů s DNA. Oxidace BaP na 2 ultimativní karcinogeny benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE) a benzo[a]pyren-9-hydroxy-4,5-epoxid, které mohou reagovat s DNA. Na oxidaci se podílejí zejména cytochromy P450 1A1 a 1B1 a epoxidhydrolasa (Hodek et al., 2013b; Stiborová et al., 2014).

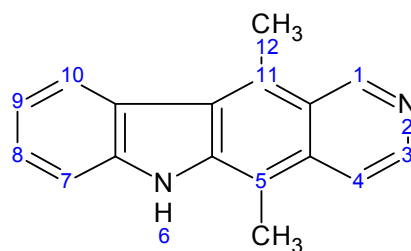
Benzo[a]pyren je kromě benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiolu oxidován cytochromy P450 na další metabolity - chinony, fenoly a dihydrodioly (Holder et al., 1974; Hundley et al., 1977; Yang et al., 1977; Autrup et al., 1978; Kim et al., 1988). Bez přítomnosti epoxidhydrolasy je BaP metabolisován systémem MFO zejména na fenoly a chinony. Mezi fenolické metabolity se řadí 3-hydroxy-, 7-hydroxy- a 9-hydroxybenzo[a]pyren (3-OH, 7-OH, 9-OH). Většina těchto metabolitů není mutagenní a vstupují do druhé fáze biotransformace (reakce se sulfotransferasami nebo glutathion-*S*-transferasou) (Gelboin, 1980). Nicméně 9-hydroxybenzo[a]pyren je prekurzorem 9-hydroxy-4,5-epoxidu, který

může rovněž tvořit adukty s DNA (Fang et al., 2001) (Obrázek 6). Mezi chinonové metabolity patří benzo[a]pyren 1,6-, 3,6-, 6,12-diony. Pro tvorbu dihydrodiolů (benzo[a]pyren 4,5-, 7,8-, a 9,10-dihydrodiol), je nezbytná přítomnost epoxidhydrolasy (Stiborová et al., 2014). Tím jak vzrůstá množství dihydrodiolů klesá zároveň množství chinonů a fenolů (Holder et al., 1974).

Je známo, že exprese cytochromů P450 je regulovaná prostřednictvím Ah receptoru (AhR) (Hockley et al., 2006). BaP se může vázat na tento receptor, aktivovat ho a ovlivnit hladinu exprese enzymů MFO systému. Genotoxický účinek benzo[a]pyrenu je závislý na několika faktorech, i) metabolické aktivaci benzo[a]pyrenu cytochromy P450 a dalšími enzymy I. fáze biotransformace, ii) detoxikaci reaktivních intermediátů vzniklých právě metabolickou aktivací, iii) rychlosti reparace poškozených úseků DNA, způsobených kovalentní modifikací a iv) indukci exprese genů kódujících proteiny zodpovědných za aktivaci, detoxikaci xenobiotik a proteinů schopných reparovat DNA (Arlt et al., 2008, 2012).

### 2.2.2 Ellipticin

Ellipticin (5,11-dimethyl-6*H*-pyrido[4,3-*b*]karbazol) (Obrázek 7) a některé jeho deriváty (9-hydroxyellipticin, 2-methyl-9-hydroxyellipticin), jsou rostlinné alkaloidy čeledi Apocynaceae. Ellipticin byl poprvé identifikován z extraktu listů rostliny *Ochrosia elliptica* (Goodwin et al., 1959).



Obrázek 7: Struktura ellipticinu.

Ellipticin a jeho polárnější deriváty vykazují významnou protinádorovou aktivitu (Dalton et al., 1967; Le Pecq et al., 1974; Rôuesse et al., 1985; Mathé et al., 1998). Využívají se hlavně ve formě acetátů k léčení karcinomu prsu s kostními metastázemi, účinné jsou též proti akutní myeloblastické leukémii, sarkomu ledvin a karcinomu štítné žlázy. Ellipticin vykazuje také anti-HIV aktivitu (Mathé et al., 1998). Hlavním důvodem

zájmu o ellipticin a jeho deriváty pro klinické využití je jejich vysoká účinnost proti nádorovým onemocněním, relativně nízké vedlejší toxické účinky (nefrotoxicita) a téměř nulová hematologická toxicita (Stiborová et al., 2001a; 2001b; DeMarini, 1983).

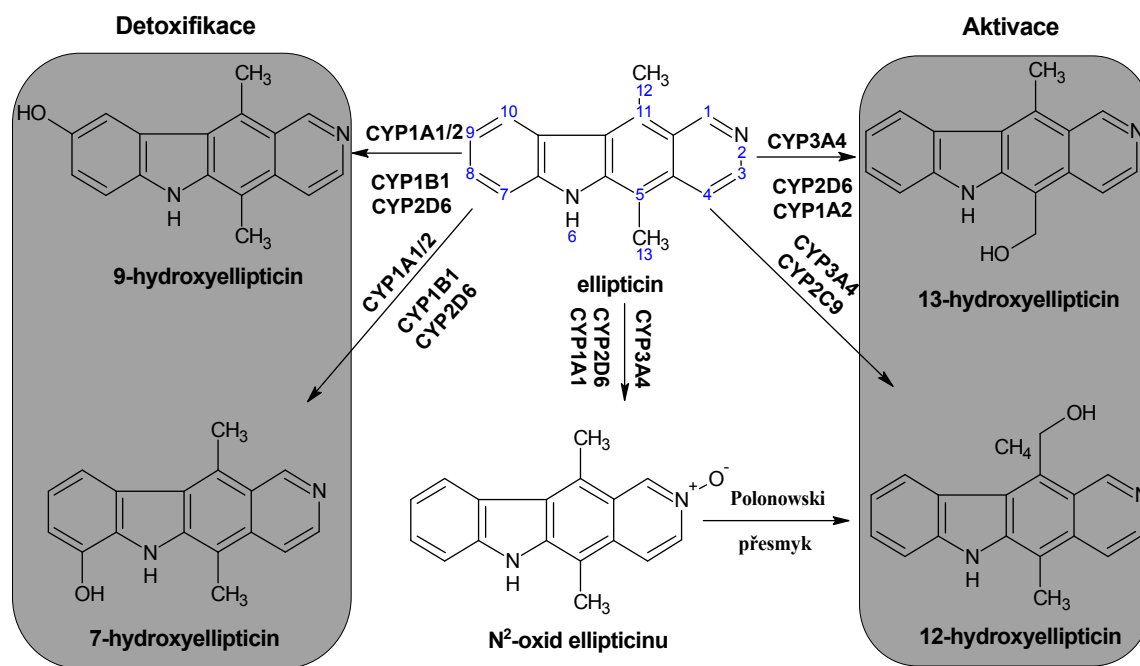
Protinádorový účinek ellipticinu je vysvětlován několika mechanismy:

1. **Interkalace do dvoušroubovicové molekuly DNA** – vyplývá z velikosti a tvaru molekuly ellipticinu. Interkalace je zprostředkována slabými reversibilními hydrofobními interakcemi s bázemi DNA (Stiborová et al., 2004a, 2006).
2. **Inhibice topoisomerasy II** – interakce s topoisomerasou II a DNA za vzniku ternárního komplexu, který vede ke zlomům v řetězci DNA a následné smrti buňky. (Stiborová et al., 2001b, 2004a, 2006; Tewey et al., 1984; Multon et al., 1988).
3. **Selektivní inhibice fosforylace proteinu p53** – prostřednictvím inhibice cyklin-dependentní kinasy (Stiborová et al., 2004a, 2006; Ohasi et al., 1995).
4. **Inhibice oxidační fosforylace** – akumulace ellipticinu v mitochondriích způsobuje narušení energetické rovnováhy v buňce (snížení obsahu ATP v buňce) (Stiborová et al., 2004a, 2006; Schawaller et al., 1995).
5. **Inhibice telomerasy** (Stiborová et al., 2006).

Výše popsané mechanismy účinku ellipticinu jsou založeny na nespecifickém působení. Nicméně, tento poznatek je v rozporu s poměrně úzkou specifitou účinku ellipticinu vůči určitým typům neoplasie. Možné vysvětlení lze hledat v enzymovém vybavení organismu. Enzymy podílející se na biotransformaci mohou produkovat účinnější metabolity léčiva, které poškozují nádor efektivněji. Právě do této kategorie „zapadá“ nedávno popsaný mechanismus účinku ellipticinu, kdy se **ellipticin** po enzymové aktivaci **kovalentně váže na DNA**, a vytváří tak **adukty s DNA**. V aktivaci ellipticinu jsou účinné cytochromy P450 nebo peroxidasy. Cílem vazby derivátů ellipticinu (13-hydroxyellipticin a 12-hydroxyellipticin) v DNA je deoxyguanosin (Stiborová et al., 2001b, 2003a, 2004a; Poljaková et al., 2007; Frei et al., 2002).

#### 2.2.2.1 Biotransformace ellipticinu a tvorba aduktů s DNA

V organismu je ellipticin přeměňován až na 5 metabolitů (*Obrázek 8*). Vedle 9-hydroxyellipticinu byly identifikovány ještě další 4 metabolity: 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin, *N*<sup>2</sup>-oxid ellipticinu jako majoritní metabolity a 7-hydroxyellipticin jako minoritní produkt. Stejně metabolity jsou také tvořeny mikrosomy jater člověka a modelových organismů (potkan, králík, myš) (Stiborová et al., 2001a).



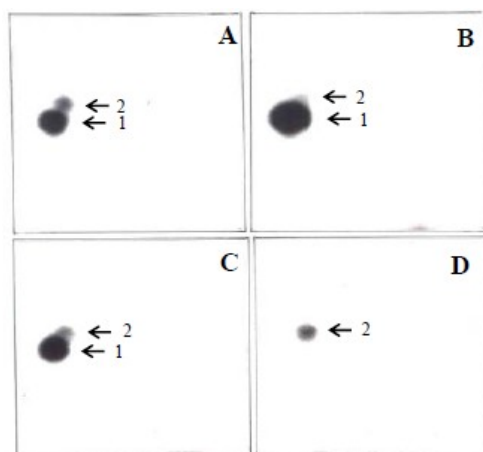
**Obrázek 8:** Metabolismus ellipticinu lidskými cytochromy P450. Upraveno dle (Stiborová et al., 2004a).

Enzymy, které participují na tvorbě metabolitů ellipticinu, patří do rodiny cytochromů P450. Z výsledků studií shrnutých na *obrázku 8* je patrné, že na metabolické aktivaci a/nebo detoxifikaci ellipticinu se podílí několik isoform cytochromů P450. Do skupiny enzymů, které se podílejí na metabolismu ellipticinu patří také peroxidasy. Oba typy enzymů jsou exprimovány v cílových nádorových tkáních, ve kterých ellipticin působí. K určení, které isoformy CYP jsou za aktivaci ellipticinu zodpovědné, bylo použito několika přístupů: selektivní inhibitory nebo induktory jednotlivých cytochromů P450, purifikované cytochromy P450 rekonstituované s NADPH:CYP reduktasou, dále mikrosomy hmyzích buněk transfekované Bakulovirem exprimující lidské cytochromy P450 a reduktasu (Supersomy<sup>TM</sup>) či korelace aktivity jednotlivých cytochromů P450 s množstvím vznikajících metabolitů. Z lidských CYP se na detoxikaci ellipticinu podílí zejména CYP1A1, 1A2, 1B1 a na aktivaci pak CYP3A4, 2C9, 2D6 a 1A2. V organismu potkana dochází k aktivaci orthologními formami CYP, přesněji CYP3A1 a CYP1A1/2, v organismu králíka pak především CYP2C3 (Stiborová et al., 2003b, 2006).

Kromě oxidace ellipticinu cytochromy P450, bylo zjištěno, že je ellipticin také oxidován peroxidasami. Zatímco CYP jsou exprimovány hlavně v prsních a ledvinách nádorových tkáních, v jiných nádorových buňkách je jejich množství řádově nižší. Například pro leukemické buňky HL-60 je ellipticin cytotoxický právě kvůli přítomnosti

myeloperoxidasy (MPO). Ellipticin je oxidován řadou peroxidas: lidskou cyklooxygenasou 2 (COX-2), ovčí COX-1, hovězí laktoperoxidasou LPO, lidskou myeloperoxidasou MPO a rostlinnou peroxidasou křenu selského (HRP) (Poljaková et al., 2005; Stiborová et al., 2007a). Metabolity ellipticinu tvořené po aktivaci peroxidasami se kovalentně váží na DNA. Adukty s DNA tvořené tímto způsobem jsou shodné s těmi, které jsou generovány z metabolitů tvořených CYP (13-hydroxy- a 12-hydroxyellipticin) (Stiborová et al., 2007a).

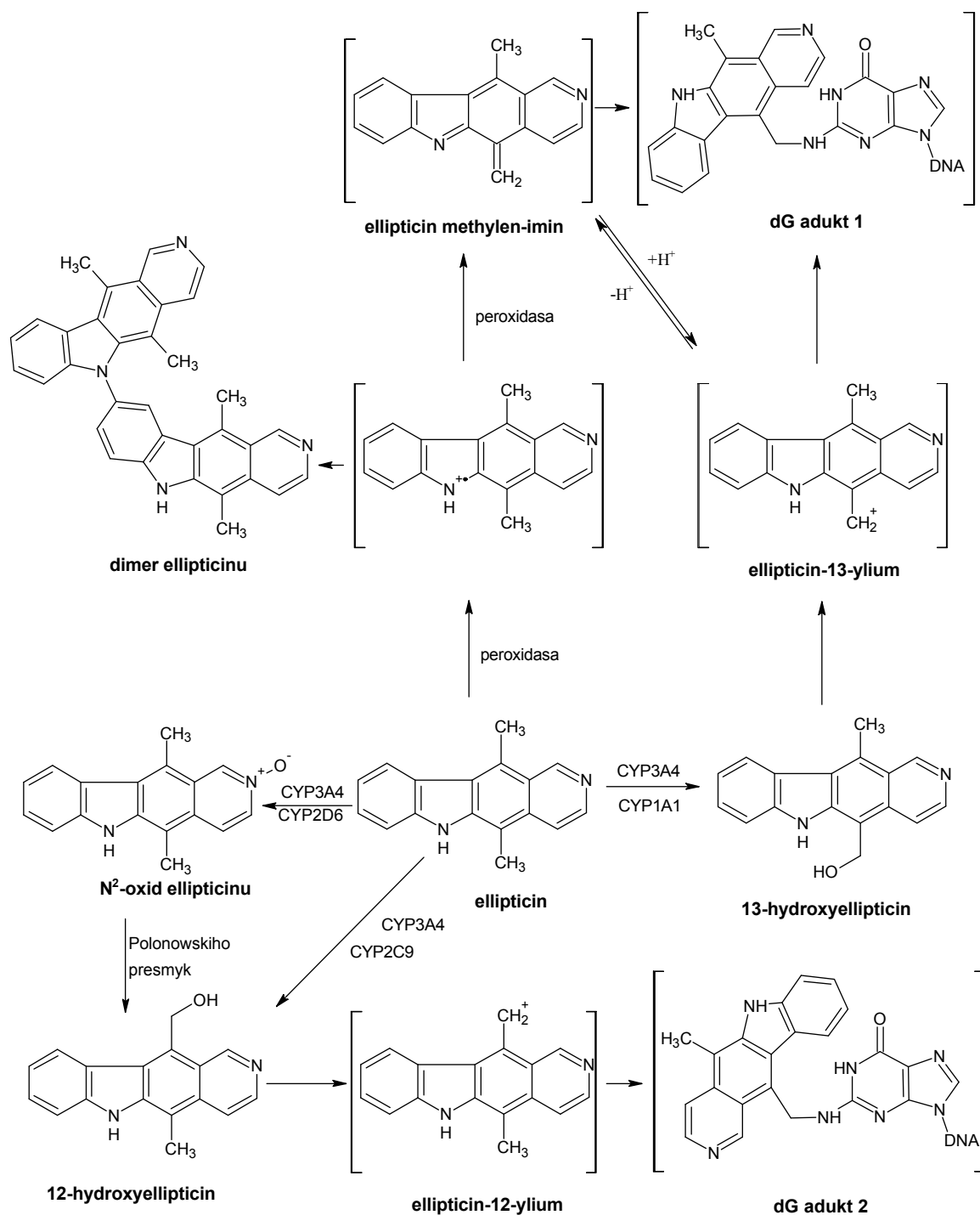
Detoxifikační metabolity ellipticinu (7-hydroxyellipticin a 9-hydroxyellipticin) postupují do II. fáze biotransformace (*kapitola 2.3*) a jsou z těla odstraněny. Vedle toho tzv. aktivační metabolity (12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a  $N^2$ -oxid ellipticinu) se podílí na tvorbě kovalentních aduktů s DNA. Tvorba aduktů metabolitů ellipticinu s DNA byla předpovězena již DeMarinim (DeMarini et al., 1992) a byla potvrzena 2 nezávislými metodami: metodou „ $^{32}\text{P}$ -postlabeling“ a použitím  $[^3\text{H}]$ ellipticinu (Stiborová et al., 2001a). Tvorba aduktů ellipticinu s DNA byla testována v některých tkáních potkana exponovaného ellipticinu (Stiborová et al., 2003a), v plicních fibroblastických buňkách křečka V-79 transfekovaných lidskými CYP (Frei et al., 2002), v lidských neuroblastomech UKF-NB-4, a IMR-32 (Poljaková et al., 2009), v nádorových buňkách prsního adenokarcinomu MCF-7 (Bořek-Dohalská et al., 2004) a v lidských leukemických buňkách HL-60 a CCRF-CEM (Poljaková et al., 2004, 2007). Pomocí metody TLC a HPLC bylo zjištěno, že se ve všech případech jedná o tytéž adukty 1 a 2 (Bořek-Dohalská et al., 2004; Stiborová et al., 2003a,b). Majoritní adukt (**adukt 1**), jehož vznik je závislý na přítomnosti aktivačních enzymů a minoritní adukt (**adukt 2**), který vznikl i bez jejich přítomnosti, pravděpodobně aktivací ellipticinu autooxidací (*Obrázek 9*) (Stiborová et al., 2001). Mimo tyto adukty, bylo detekováno (*in vivo* v některých tkáních potkana, v buňkách V-79, MCF-7 a HL-60) dalších 5 minoritních aduktů (Stiborová et al., 2007a, 2007b).



**Obrázek 9:** Autoradiografie aduktů 1, 2 elliptycinu s DNA detekované metodou „ $^{32}\text{P}$ -postlabeling“. Adukty byly pozorovány po aktivaci cytochromy P450 potkana (A), králíka (B) člověka (C) a bez enzymové aktivace (D) (Stiborová et al., 2003b).

Metabolity, které jsou prekursory sloučenin, tvořící adukty s DNA jsou 13-hydroxyellipticin a 12-hydroxyellipticin, případně  $N^2$ -oxid elliptycinu, který podléhá Polonowského přesmyku za vzniku 12-hydroxyelliptycinu. 13-hydroxyellipticin a 12-hydroxyellipticin se rozpadají na ellipticin-13-ylum a ellipticin-12-ylum, které se vážou na DNA a vytváří adukty 1 (majoritní) a 2 (minoritní).

**Ellipticin-13-ylum** a **ellipticin-12-ylum** (Obrázek 10) jsou předpokládanými reaktivními agens, tvořenými z 13-hydroxy- a 12-hydroxyelliptycinu, které jako reaktivní karbeniové ionty mohou tvořit kovalentní vazbu s amino skupinou guaninu v DNA (Stiborová et al., 2004a; Poljaková et al., 2009).



**Obrázek 10:** Oxidace ellipticinu lidskými CYP a peroxidasami na metabolity, které poskytují adukty s DNA. Sloučeniny v závorkách nebyli doposud experimentálně prokázány. Upraveno podle (Stiborová et al., 2008).

### 2.2.3 Mezidruhové rozdíly v metabolismu karcinogenů a léčiv

Zvířecí modely jsou běžně používány ve vývoji nových léků a sloučenin k predikci metabolického osudu nového léčiva v lidském organismu. Je však důležité si uvědomit, že lidé se od zvířat liší zastoupením jednotlivých isoformů enzymů, jejich katalytickou

aktivitou a mírou exprese, které se podílí na metabolismu těchto sloučenin (Guengerich, 1997). V metabolismu cizorodých látek a v profilu metabolitů, které vznikají, můžeme pozorovat velké mezidruhové rozdíly. Tato mezidruhová rozdílnost se musí brát v úvahu při extrapolaci zjištěných dat ze zvířecích modelů na člověka. Jako příklad může posloužit *N*-hydroxylace 2-acetylaminofluorenu (FAA) na proximální karcinogen u potkanů, myši a lidí, ale ne u morčete (Weisburger et al., 1964). V minulosti byl FAA používán jako pesticid a až po provedení několika studií této sloučeniny byly potvrzeny karcinogenní účinky u potkanů a později u lidí. Kdyby byl na začátku zvolen model morčete mohl by tento proces trvat mnohem déle anebo by se vůbec neodhalila karcinogenita FAA. Tyto a další podobné studie ukazují, že je důležité vyhodnotit potenciální karcinogeny u živočišných druhů se stejným metabolickým profilem jako u lidí. Na druhé straně žádný zvířecí model není zcela podobný člověku z hlediska enzymového zastoupení a aktivity CYP (Arinc et al., 2013).

Nicméně, podobnosti lze nalézt pro některé specifické isoformy CYP. Například je známa pouze jediná isoforma CYP2E1, která nevykazuje rozdíly v katalytické aktivitě a expresi mezi jednotlivými živočišnými druhy (Guengerich, 1997; Boagards et al., 2000). Co se týče podrodiny CYP1A, u všech druhů byly popsány 2 isoformy CYP1A1 a CYP1A2, i když s různou mírou exprese a s odlišnou katalytickou aktivitou. Podobně i enzymy podrodiny CYP2C, 2D a 3A a jejich katalytická aktivita je závislá na zvířecím druhu (člověk, potkan, myš, opice, morče atd). Výběr zvířecího modelu tedy závisí i na konkrétním typu studie (metabolismus, indukce, inhibice). Neméně důležitými jsou studie nových sloučenin *in vitro*, kde se používají hepatocyty, jaterní mikrosomy nebo „čisté“ rekombinantní cytochromy P450 (Martignoni et al., 2006).

## 2.3 Biotransformace xenobiotik

Za biotransformaci xenobiotik jsou označovány procesy, které by měly vést k jejich snadnému vyloučení z organismu nebo potlačení toxicity. V takovém případě hovoříme o **detoxifikaci** cizorodé látky. Naopak, když biotransformační reakce vedou k transformaci sloučeniny na metabolicky toxičtější látku, jedná se o tzv. **aktivaci**. Jde zejména o aktivaci nemutagenních látek na mutageny nebo proléčiva na účinná léčiva (Chromá et al., 2001). Takovou metabolickou aktivaci vyžaduje řada léčiv např. ellipticin nebo



karcinogeny jako benzo[a]pyren, nitrosaminy nebo Sudan I (Stiborová et al. 2001a; Arlt et al., 2008).

V živočišných organismech se rozlišují dvě fáze biotransformačních reakcí – **fáze I** a **fáze II**. V první fázi se do hydrofobní molekuly cizorodé látky zabudovává reaktivní polární skupina nebo se odkrývá funkční skupina již přítomná v molekule xenobiotika. Proto se tato fáze nazývá **derivatizační**. To se děje především oxidačními reakcemi, ale i redukčními, případně hydrolytickými. Mezi oxidační reakce patří C-hydroxylace, N-hydroxylace, N-oxidace, S-oxidace, dealkylace, deaminace, epoxidace a oxidace alkoholů. Mezi hlavní enzymy, které katalyzují tyto reakce, patří **systém monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO) s cytochromem P450 jako terminální oxidasou** (*kapitola 2.4*). Dále na reakcích participují **peroxidasy**, flavínové monooxygenasy, dioxygenasy, alkoholdehydrogenasa, aldehyddehydrogenasa, katalasa, epoxidhydroxylasa. Z redukčních enzymů to jsou xantinoxidasa, NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa a NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (Stiborová et al., 2004b, 2011b).

Takto polarizované sloučeniny vstupují do II. fáze biotransformace. Ve druhé fázi dochází ke **konjugaci** těchto polarizovaných molekul s endogenními látkami (kyselina glukuronová, glycin, taurin, aktivní sulfát, glutathion, cystein, aktivní acetát atd.) (Stiborová, 2002a). Těmito reakcemi se ještě dále zvyšuje polarita původně hydrofobní cizorodé látky a pak může být eliminována z buněk a vyloučená z organismu. Většina konjugačních reakcí jsou reakce detoxikační a vzniklé konjugáty jsou transportovány a vylučovány. Nicméně za určitých podmínek i vznik konjugátu může vést k tvorbě aktivního metabolitu a zvýšení jeho toxicity. Enzymy, které katalyzují konjugační reakce, patří hlavně do skupiny **transferas**. Jsou to zejména UDP-glukuronosyltransferasy, sulfotransferasy, N-acetyltransferasy a glutathion-S-transferasy (Knejzlík et al., 2000; Zobe et al., 2000; Xu et al., 2005).

Metabolismus cizorodých látek v buňkách probíhá většinou v endoplasmatickém retikulu a cytosolu, ale jsou i další místa, jako mitochondrie a plasmatické membrány. Enzymy I. fáze jsou lokalizovány téměř výhradně v endoplasmatickém retikulu spolu s enzymem II. fáze, glukuronosyltransferasou. Naopak enzymy II. fáze včetně glutathion-S-transferasy jsou lokalizovány převážně v cytoplasmě.

## 2.4 Systém oxidas se smíšenou funkcí – MFO systém

Mikrosomální monooxygenasový systém nebo systém oxygenas (oxidas) se smíšenou funkcí (z angl. mixed function oxidases – MFO) je soubor enzymů lokalizovaných na vnější straně endoplasmatického retikula. Tento systém participuje na řadě oxidačních, oxygenačních nebo redukčních reakcích. Je složen ze tří základních složek: **NADPH:cytochrom P450 reduktasa (CPR)**, **cytochrom P450 (CYP)** a **membrána** kde jsou tyto dva enzymy zanořené. Některé cytochromy P450 jsou také lokalizované v membráně mitochondrií a nalezené byly, také ve vnější jaderné membráně, peroxisomech, plasmatické membráně či v Golgiho komplexu (Seliskar a Rozman, 2007). Fakultativně může být součástí MFO systému i cytochrom  $b_5$  a NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasa (Ioannides a Parke, 1987; Sheweita, 2000; Stiborová et al., 1999).

Monooxygenasový systém katalyzuje reakce, při nichž se jeden atom biatomické molekuly kyslíku inkorporuje do substrátu a druhý atom je redukován na vodu. Monooxygenasy lze klasifikovat do dvou velkých skupin, a to na monooxygenasy obsahující cytochrom P450 a na flavinové monooxygenasy (Stiborová et al., 2004b).

### 2.4.1 Cytochromy P450

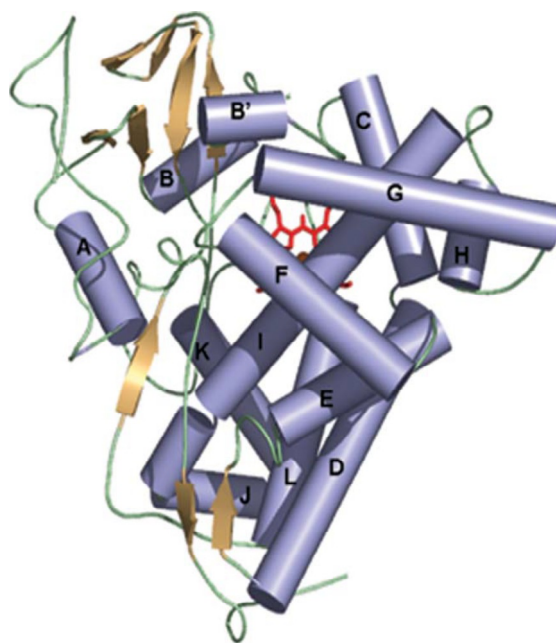
Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1) tvoří jednu z největších a nejstarších genových rodin (Degtyarenko a Archakov, 1993). Poprvé byl tento enzym popsán v roce 1958 Klinbergerem a Garfínkelem, kteří detekovali v jaterních mikrosomech pigment, který vykazoval po redukci v komplexu s oxidem uhelnatým absorpční maximum při 450 nm (Garfinkel, 1958; Klingenberg, 1958). Až v roce 1964 bylo potvrzeno, že tento pigment má hemoproteinový charakter (podobnost s cytochromem  $b_5$ ) a jeho jméno bylo odvozeno od netypického maxima Soretova pásu při 450 nm. (Omura a Sato, 1964). Důvodem těchto zvláštních spektrálních vlastností je neobvyklá vazba hemového železa. Pátým (proximálním) ligandem centrálního atomu železa v hemu je totiž sulfhydrylová skupina cysteinu přítomného v aktivním centru (klasické hemoproteiny – vazba přes imidazolový zbytek histidinu), proto by se tyto proteiny měli spíše nazývat „**hemthiolátové**“ proteiny (Murakami a Mason, 1967; Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, 1991; Anzenbacher et al., 1989). Šestým ligandem je atom kyslíku molekuly vody (Felsted et al., 1973).

CYP byly identifikovány v mnoha organismech od prokaryotických až po většinu

organismů eukaryotických, jako jsou např. kvasinky, rostliny, hmyz, ryby a další obratlovce (Nebert et al., 1987, 1991). Bylo zjištěno, že v lidském genomu se nachází 57 genů a 58 pseudogenů pro CYP, u myši je to 103 genů a u potkanů 89 (Sundberg, 2005; Cytochrom P450 homepage). Tyto enzymy hrají důležitou roli v metabolismu široké škály endogenních i exogenních substrátů. Kromě oxidace a redukce xenobiotik (polycyklické aromatické uhlovodíky, polycyklické aromatické nitrosloucheniny, léčiva atd.) se také podílejí např. na biosyntéze cholesterolu, steroidních hormonů, žlučových kyselin nebo oxidačním metabolismu mastných kyselin (Denisov et al., 2005; Stiborová et al., 1999). Existují také cytochromy P450, u kterých ještě doposud nebyla popsána jejich úloha v metabolismu endogenních a/nebo exogenních sloučenin. Takové CYP se nazývají „orfánové“ (z angl. orphan – sirotek) (*kapitola 2.4.1.4*) (Stark a Guengerich, 2007; Guengerich a Cheng, 2011).

Systém cytochromů P450 je v eukaryotických buňkách vázán v membráně endoplasmatického retikula nebo mitochondrií prostřednictvím transmembránového  $\alpha$ -helixu na N-konci proteinu. Nicméně stále není objasněno, jak jsou cytochromy P450 v membráně endoplasmatického retikula organizovány, ale předpokládá se, že alespoň některé CYP tvoří oligomerní komplexy (Kawato et al., 1982; Seliskar et al., 2007). Mitochondriální cytochromy P450 jsou lokalizovány na vnitřní mitochondriální membráně a globulární část je orientovaná do matrix mitochondrií (Edwards et al., 1991; Seliskar et al., 2007). Bakteriální cytochromy P450 jsou enzymy rozpustné.

I když je sekvenční podobnost mezi jednotlivými CYP menší než 20 %, jejich obecné prostorové uspořádání je vysoce konzervované. Nejvíce konzervované oblasti se vyskytují v tzv. „jádrě“ proteinu, v oblasti kde se váže hem. Naproti tomu nejvíce variabilní oblasti se vyskytují v místě zanořené do membrány a v místě vazby substrátu. Právě díky tomu mají cytochromy P450 schopnost metabolizovat tak širokou škálu hydrofobních substrátů (Reichhart a Feyereisen, 2000).



**Obrázek 11:** Prostorové uspořádání cytochromu P450. Na obrázku se nachází CYP1A1A.  $\alpha$ -helixy (fialová barva jsou označena dle standardní nomenklatury (Munro et al., 2007).

Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách (isoenzymech, isoformách), které jsou řazeny do genetických rodin a podrodin podle míry homologie jejich primární struktury. Do stejné rodiny náleží cytochromy P450, u kterých byla nalezena více než 40% homologie aminokyselinové sekvence jejich proteinů, do stejné podrodiny pak ty, které vykazují homologii větší než 55 %. Cytochromy P450 jsou označovány zkratkou „CYP“, za kterou následuje arabská číslice udávající genovou rodinu a velké písmeno udávající genovou podrodinu. Poslední číslice označuje individuální gen (Nelson et al., 1996).

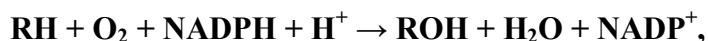
#### 2.4.1.1 Struktura a enzymové funkce CYP

Cytochromy P450 existují ve dvou spinových formách a jejich rovnováha je ovlivněna především axiálními ligandy železa. Když je ion železa hexakoordinován a hemové železo interaguje ještě s jedním ligandem (např. s atomem kyslíku z vody, – OH, – COOH) hovoříme o **nízkospinové formě** (spin 1/2). Ion železa je v rovině porfyrinového skeletu a maximum absorbance Soretova pásu je při 418 nm. Navázáním substrátu do vazebného místa dochází k vytlačení šestého ligandu a tedy k nárůstu **vysokospinové formy** (spin 5/2). Ion železa je v pentakoordinovaném stavu a je „vytahován“ thiolátovou skupinou nad rovinu porfyrinového skeletu. Maximum Soretova pásu této formy je při 390 nm (Gut et al., 1992; Ortiz de Montellano a De Voss, 2005).

Nejtypičtější reakcí katalyzovanou cytochromy P450 je monooxygenasová reakce, při které dochází k aktivaci molekulárního kyslíku (**oxidasová aktivita**) a zabudování jednoho kyslíkového atomu do molekuly substrátu (**oxygenasová aktivita**), zatímco druhý atom je redukován na vodu. Při dalším typu reakce, nedochází k aktivaci O<sub>2</sub>. Elektrony jsou přeneseny NADPH:cytochrom P450 reduktasou přímo na substrát (**redukční aktivita**), který je vázán jako šestý ligand místo kyslíku (Guengerich, 2001). Místo kyslíku může CYP využít organický peroxid nebo peroxid vodíku (**peroxidasová aktivita**). V těchto reakcích není potřeba další donor elektronů, ale stejně jako při klasickém mechanismu je výsledkem reakce hydroxylovaný substrát (Blake a Coon, 1981; Anari et al., 1997). Za určitých podmínek může nastat situace, když po aktivaci kyslíku nedojde k jeho zabudování do substrátu, ale takto aktivovaný kyslík je uvolněný do prostoru, kde z něho může vzniknout H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**produkce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a aktivních forem kyslíku**) (Guengerich 1991, 2001).

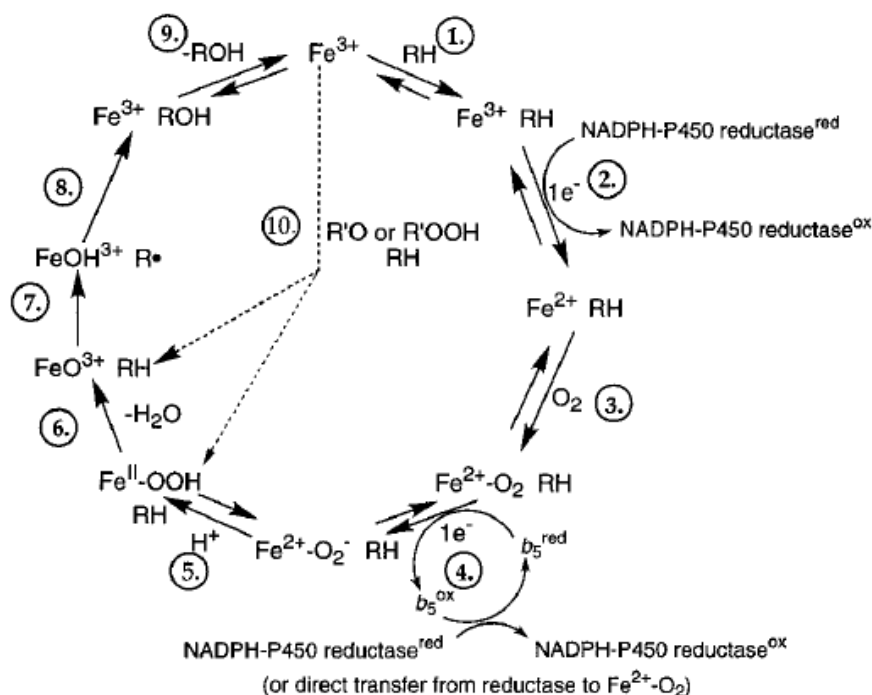
### 2.4.1.2 Mechanismus katalýzy CYP

Monooxygenasovou reakci katalyzovanou MFO systémem lze vyjádřit sumární rovnicí:



kde RH je substrát a ROH hydroxylovaný produkt reakce. Elektrony potřebné k redukci dodává z NADPH enzym NADPH:cytochrom P450 reduktasa. Na *obrázku 12* je znázorněn reakční cyklus CYP (Heinemann a Ozols, 1983).

V prvním kroku dojde k navázání substrátu (RH). Ion železa je v klidovém stavu ve ferri formě ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a je hexakoordinován. Navázáním substrátu dojde ke konformační změně, „vytlačí“ se šestý ligand a železo přejde do pentakoordinovaného stavu. Následně dochází k přenosu prvního elektronu z NADPH prostřednictvím NADPH:cytochrom P450 reduktasy (**reakce 2**), a tím k redukci hemového železa na ferro formu ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Železo stále zůstává pentakoordinováno (vysokospinový stav). Tato forma enzymu je schopna vázat molekulu kyslíku (ale i např. CO). Navázáním kyslíku vzniká ternární komplex (**reakce 3**), kde je ion železa opět hexakoordinován a v nízkospinové formě. Tento nestabilní komplex je redukován CPR nebo cytochromem  $b_5$  za vzniku ferrosuperoxidového komplexu (**reakce 4**). Komplex cytochromu P450 s biatomickou molekulou kyslíku po druhé redukci je již zcela aktivovanou formou cytochromu P450, ve které dochází k heterolytickému štěpení vazby O-O. Jeden atom kyslíku přijme dva protony a je uvolněn jako molekula vody, druhý atom kyslíku zůstává vázán na iontu Fe v hemu ve formě ferri-oxenového komplexu (**reakce 5+6**). Vzniklý reaktivní radikál je pak schopen vytrhnout vodíkový atom z molekuly substrátu za vzniku radikálu z molekuly substrátu a hydroxylového aniontu vázaného na ion železa (**reakce 7**). Dochází k mezomernímu posunu elektronu (**reakce 8**) za vzniku formy, která má navázané dva radikály (OH a substrát). V posledním kroku (**reakce 8**) reakčního cyklu dochází k rekombinaci radikálů za vzniku nativní formy cytochromu P450 a hydroxyderivátu (ROH) (Blake a Coon, 1981; Guengerich, 2001; Chromá et al., 2001; Ortiz de Montellano a De Voss, 2005; Denisov et al., 2005).



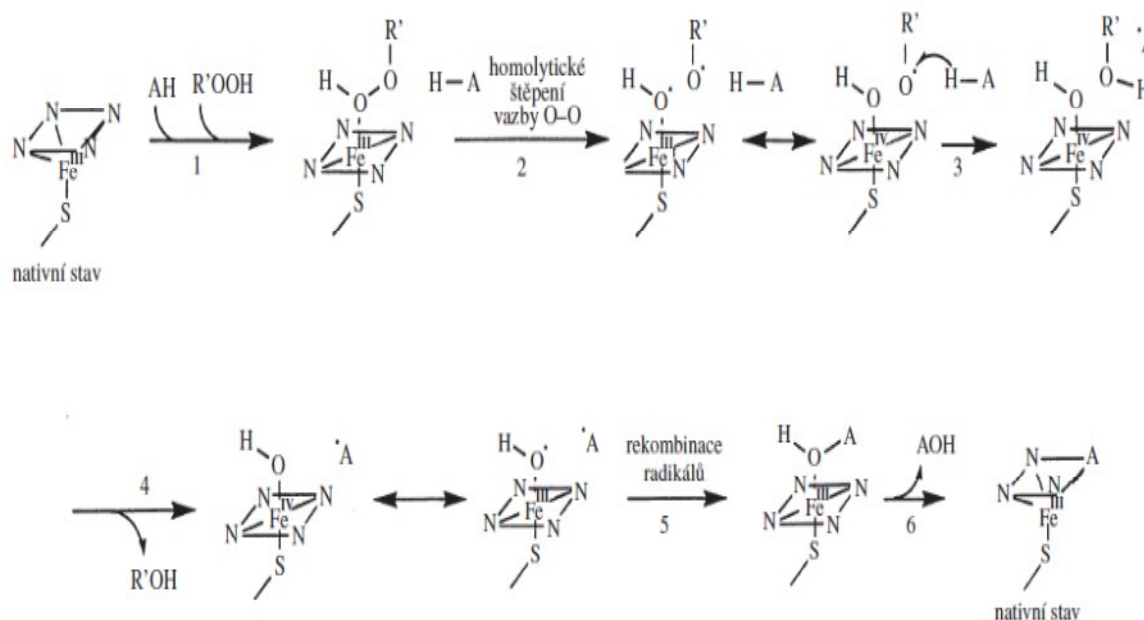
**Obrázek 12:** Reakční cyklus cytochromu P450. Fe, atom hemového železa v aktivním místě; RH - substrát; ROH - produkt monooxygenasové reakce; ROOH - peroxid, který může sloužit jako alternativní donor kyslíku (Guengerich, 2001).

Jak již bylo zmíněno výše cytochrom P450 může pro oxidační reakce využívat i organické peroxidy, které se tak stávají donorem kyslíku. Podobně mohou reagovat i hydroperoxidy vzniklé peroxidací lipidů. Běžně používaným substrátem CYP je kumoylhydroperoxid. Tento typ reakce nevyžaduje CPR a ani NADPH jako zdroj elektronů (Coon et al., 1992; Denisov et al., 2005; Munro et al., 2007). Sumární rovnice peroxidasové aktivity cytochromů P450 je následující:



kde AH je substrát a R'OOH je hydroperoxid, AOH hydroxylovaný produkt reakce a R'OH alkohol vzniklý redukcí hydroperoxidu. Na *obrázku 13* je zobrazený předpokládaný mechanismus peroxidasové reakce CYP. V prvním kroku se naváže do aktivního centra CYP substrát a hydroperoxid. Následně dochází k homolytickému štěpení vazby O-O v hydroperoxidu, za vzniku hydroxylového radikálu a příslušného alkoxylového radikálu (*reakce 2*). Tento alkoxylový radikál odštěpí atom vodíku z molekuly substrátu za vzniku radikálu (*reakce 3*). Redukovaný hydroperoxid se uvolní z enzymu (*reakce 4*). Hydroxylový radikál a radikál substrátu spolu reagují za vzniku

hydroxylovaného substrátu (*reakce 5*), který se uvolní a cytochrom P450 se vrátí do nativního stavu (*reakce 6*). Účinnost oxidace organických substrátů peroxidasovou aktivitou CYP je obvykle nižší než reakce za přítomnosti NADPH a  $O_2$  (Blake a Coon, 1981; Chromá et al., 2001; Hollenberg, 1992).



**Obrázek 13:** Praveděpodobný mechanismus peroxidasové aktivity cytochromu P450; R'OOH-organický peroxid nebo  $H_2O_2$ , AH-substrát, R'OH-alkohol vzniklý redukcí hydroperoxidu nebo voda vzniklá redukcí  $H_2O_2$ , AOH – oxidovaná molekula substrátu (Chromá et al., 2001).

#### 2.4.1.3 Regulace exprese cytochromů P450

Množství cytochromů P450 v jednotlivých tkáních nelze brát absolutně. Jejich obsah v lidských tkáních je závislý na mnoha faktorech, jako je např. **genetický polymorfismus**, vliv vnějších podmínek (environmentální polutanty chemické povahy), výživa, věk, kouření, konzumace alkoholu, působení podávaných léčiv. Genetický polymorfismus se dá charakterizovat jako vrozená změna DNA v kódující či regulační oblasti genu, která může vést k absenci některé formy cytochromu P450, ke změně inducibility, nebo může docházet ke vzniku formy enzymu s pozměněnou katalytickou aktivitou. Za genetický polymorfismus lze označit geneticky podmíněnou odlišnost, která se vyskytuje minimálně u 2-3 % populace (Stiborová et al., 1999b; Guengerich, 2005). Regulace exprese cytochromů P450 je řízena několika systémy. Jedná se o regulaci

exprese na genové úrovni, zahrnující funkci specifických receptorů, rychlost přepisu DNA do RNA či stabilizaci syntetizované mRNA, a dále o posttranslační regulaci založenou především na stabilizaci molekuly proteinu daného cytochromu P450 (Souček a Gut, 1993).

V závislosti na tom, jestli je možné ovlivnit množství CYP, se tyto enzymy dělí na **konstitutivní** a **inducibilní**. Indukce enzymů je definována jako nárůst exprese katalyticky aktivních forem enzymů, kdy dochází ke zvýšení transkripce na základě stimulace chemickým signálem (Souček a Gut, 1993). Indukce cytochromů P450 cizorodými látkami je zprostředkována intracelulárním i cytosolární receptory (AhR) nebo jadernými (PXR, CAR, PPAR) (Dickins, 2004). Indukce cytochromů P450 většinou zvyšuje biotransformaci xenobiotika, která by měla vést k jeho detoxikaci a k vyloučení z organismu. Některé cytochromy P450 však mohou nereaktivní sloučeninu přeměňovat na chemicky aktivní, toxické či kancerogenní intermediáty. U léčiv vyžadujících metabolickou aktivaci může indukce cytochromu P450 vést ke zvýšení jejich farmakologického účinku (Stiborová a Mikšanová, 1999a). Aktivita cytochromů P450 může být ovlivněna také negativně. Pak se tyto látky nazývají inhibitory.

#### 2.4.1.4 Cytochrom P450 2S1

Asi čtvrtina z 57 identifikovaných lidských cytochromů P450 je označována jako tzv. „orfánová“, protože informace o jejich funkci, expresi a regulaci jsou stále pouze minimální. Do této skupiny CYP patří CYP 2A7, **2S1**, 2U1, 2W1, 3A43, 4A22, 4F11, 4F22, 4V2, 4X1, 4Z1, 20A1 a 27C1 (Guengerich et al. 2005, 2010, 2011; Stark a Guengerich, 2007). Nicméně na tzv. „deorfánizaci“, neboli charakterizování funkcí enzymu, se zaměřuje mnoho výzkumných skupin. Některé z „orfánových“ CYP již byly získány heterologní expresí a pro mnoho z nich bylo popsáno místo exprese mRNA (Wang et al., 2005; Kumar, 2005; Ducassou et al., 2015; Mrízová et al., 2016).

Gen pro cytochrom P450 2S1 je lokalizovaný na chromosomu *19q13.2* a cDNA kóduje proteinový řetězec o délce 504 aminokyselin a molekulové hmotnosti 55,8 kDa. CYP2S1 má na N-konci hydrofobní úsek, ve svém řetězci obsahuje také oblast bohatou na prolin a konzervovaný cystein, který je pátým ligandem železa v hemové skupině cytochromu. Metodou „Dot blot“ a „Northern blot“ bylo potvrzeno, že mRNA *cytochromu P450 2S1* je exprimována zejména v plicích, v průduškách, žaludku, tenkém střevě a ve slezině. V menším zastoupení byla nalezena také v játrech, ledvinách, brzlíku, placentě,



periferních leukocytech a kůži (Smith et al., 2003; Saarikoski et al., 2004, 2005). Samotný protein CYP2S1 byl exprimován v plicích, střevech a kůži (Rylander et al., 2001). Kromě lidské isoformy CYP2S1 byla popsána také orthologní forma enzymu u **myši a potkana** (Rivera et al., 2002). Myší a lidská forma CYP2S1 vykazují 78% totožnost v aminokyselinové sekvenci a potkaní 76% homologii s lidským a 93% s myším cytochromem P450 2S1.

Studie *in vivo* za použití myši prokázaly, že transkripce CYP2S1 je regulována Ah receptorem. Stejně výsledky byly zaznamenány i v studiích s modelem potkana (Rivera et al., 2002; Deb a Bandiera, 2010). Bylo zjištěno, že exprese genu pro CYP2S1 je indukována dioxinem, hypoxií, UV zářením, černo-uhelným dehtem a *trans*-retinovými kyselinami (Rivera et al., 2002; Smith et al., 2003).

Předpokládalo se, že podobně jako jiné CYP, které jsou rovněž indukovatelné dioxinem, bude CYP2S1 participovat na biotransformaci chemických karcinogenů včetně látek vznikajících při kouření. Proto byly vybrány hlavní složky cigaretového kouře, které mají karcinogenní účinek a byly testovány jako substráty CYP2S1. Výsledky této studie poukázali na skutečnost, že CYP2S1 nekatalyzuje metabolické přeměny nikotinu a nepodílí se na metabolické aktivaci testovaných plicních karcinogenů (Wang et al., 2005). I když jsou *trans*-retinové induktory CYP2S1 a byly testovány jako substrát pro tento enzym (Smith et al., 2003), nebyly tyto výsledky v opakovaných pokusech potvrzeny (Wu et al., 2006). Podobně ani další z 30 testovaných látek (naftalen, benzo[a]pyren atd.) nebyly přeměňovány (Wu et al., 2006).

Bui se spolupracovníky ve svých pracích postulovali, že **CYP2S1 není redukován NADPH:cytochrom P450 reduktasou (CPR)** (Bui a Hankinson, 2009a), ale že ke své aktivitě **využívá kumoylhydroperoxid a peroxid vodíku** (*kapitola 2.4.1.2*). V této metabolické studii bylo potvrzeno, že CYP2S1 participuje na **oxidaci BaP-7,8-diolu** na karcinogenní metabolit BaP-7,8-dihydrodiol-*trans*-9,10-epoxid (BPDE). Jako další kofaktory byly testovány hydroperoxydy mastných kyselin (Bui et al., 2009b). Dále bylo zjištěno, že se CYP2S1 podílí na účinné metabolické aktivaci protinádorového léčiva AQ4N. Vedle toho autoři této studie poukázali na skutečnost, že **CYP2S1 je efektivně redukován i NADPH:CYP reduktasou (CPR)** (Nishida et al., 2010). Důvodem rozporu jestli CYP2S1 účinně interaguje s CPR nebo ne, může být fakt, že Bui se spolupracovníky použili ve všech experimentech aerobní podmínky, zatímco Nishida a kolektiv podmínky anaerobní. Je tedy nutné dále studovat, zda se CPR podílí na redukci CYP2S1 i za aerobních podmínek (Gomez et al., 2010).

### 2.4.2 NADPH:cytochrom P450 reduktasa

Enzym NADPH:cytochrom P450 reduktasa (CPR) (EC 1.6.2.4) je membránově vázaný protein, který katalyzuje přenos elektronů z NADPH na cytochrom P450 (Shen et al., 1989). CPR je jeden ze dvou savčích enzymů, který obsahuje FMN i FAD prostetickou skupinu (druhý je NO-synthasa). CPR může taky přenášet elektrony na hem oxygenasu (Schachter et al., 1972) a cytochrom  $b_5$  (Enoch a Strittmatter, 1979).

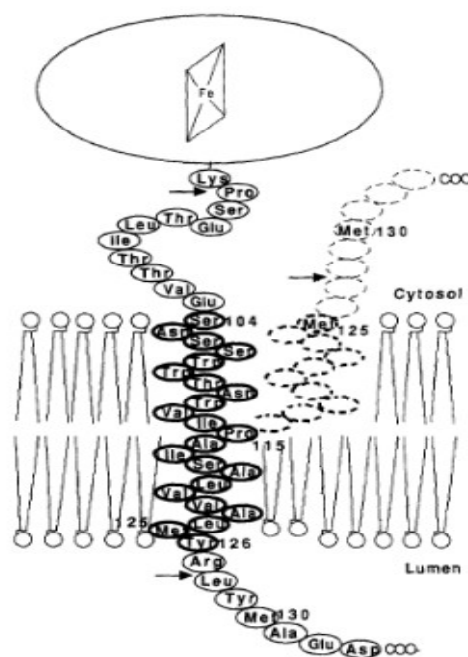
CPR vykazuje poměrně vysokou aminokyselinovou homologii mezi jednotlivými biologickými druhy. To poukazuje na důležitost tohoto enzymu v průběhu evoluce (Shen a Kasper, 1993). NADPH:cytochrom P450 reduktasa má dvě funkční domény, hydrofobní terminální (6 kDa), kterou je zakotvena v membráně a hydrofilní C-terminální katalytickou doménu (72 kDa). C-terminální funkční doména se skládá z **FMN**- (zodpovědná za přenos elektronů na CYP) a **FAD**-vazebné (zodpovědná za nekovalentní vazbu NADPH) strukturní **domény**. Přenos elektronů mezi flaviny je přímý, není zprostředkovaný zbytkem aminokyseliny, a proto je tento přenos rychlý (Kasper, 1971; Wang et al., 1997).

Interakce mezi NADPH:cytochrom P450 reduktasou a cytochromem P450 jsou elektrostatické povahy. Kladně nabitý povrch cytochromu P450 (lysiny, argininy) interaguje se záporně nabitým povrchem NADPH:cytochrom P450 reduktasy (aspartát, glutamát). Dále se uplatňují také hydrofobní interakce mezi nepolárními aminokyselinami (leucin, tryptofan, valin) v oblasti membránových domén CPR a CYP (Wang et al., 1997; Tambutrini a Schenkman, 1986).

### 2.4.3 Cytochrom $b_5$

Cytochrom  $b_5$  (cyt  $b_5$ ) je hemoprotein (cca 15 kDa), který je vázán v membráně endoplasmatického retikula (Lu et al., 1995), jehož součástí je nekovalentně vázaná jedna či dvě molekuly hemu b (Von Jagow a Sebald, 1980). Původně se označoval jako cytochrom m (m jako mikrosomy), protože byl přítomný v mikrosomech (subcelulární frakce získaná z endoplasmatického retikula po rozbití a ultracentrifugaci buněk) (Schenkman a Jansson, 2003). U savců je cyt  $b_5$  přítomný ve třech isoformách, jako integrální protein lokalizovaný na vnější straně membrány endoplasmatického retikula, na vnější straně mitochondrií a jako rozpustný protein v cytoplasmě maturovaných erytrocytů. Tento hemoprotein se vyskytuje nejen u zvířat a rostlin, ale i hub. Cyt  $b_5$  se

podílí na desaturaci cholesterolu, biosyntéze cholesterolu a plasmalogenů, redukcí methemoglobinu a participuje v hydroxylačních reakcích, katalyzovaných MFO systémem cizorodých a endogenních látek (Vergeres a Waskell, 1995a). Proteinová struktura mikrosomálního cyt  $b_5$  je uspořádaná do 2 domén: větší globulární **N-terminální** (hydrofilní) domény, která obsahuje hem b a **C-terminální** (hydrofobní) domény sloužící k ukotvení cyt  $b_5$  v membráně endoplasmatického retikula (Mathews, 1985). Přesný model membránově-vázané domény však zatím nebyl vyřešen. Existují 2 modely (konformace), které popisují možné uspořádání v membráně ER. První je tzv. transmembránový model, kde hydrofobní doména tvořená z 22 hydrofobních aminokyselin, prochází lipidovou dvouvrstvou ER a C-konec aminokyselinové sekvence je v lumen ER. Ve vlásenkové konformaci (angl. „hairpin loop conformation“) hydrofobní oligopeptid prostupuje pouze do vnější lipidové vrstvy a C-konec je v cytosolu (Obrázek 14) (Vergeres et al., 1995b). Na iontových interakcích mezi cytochromem  $b_5$  a dalšími elektronovými přenašeči a na interakcích tohoto páru přenašečů s ostatními proteiny se podílejí



**Obrázek 14:** Schéma předpokládaného ukotvení cyt  $b_5$  v membráně ER (Strittmatter et al., 1990).

záporně nabitě aminokyseliny (glutamát, aspartát) (Strittmatter et al., 1990). Cyt  $b_5$  může přijmout elektron od NADPH:cytochrom P450 reduktasy, od NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasy a předat jej na příklad cytochromu P450, cytochromu c, metmyoglobinu nebo methemoglobinu (Schenkman a Jansson, 2003).

Působení cytochromu  $b_5$  v rámci MFO systému není zcela objasněné. Existuje několik hypotéz, které se snaží vysvětlit mechanismus působení cyt  $b_5$  (Schenkman a Jansson, 2003). **První** hypotéza předpokládá, že dochází k **přímému přenosu elektronu z cyt  $b_5$  na cytochrom P450**. Cyt  $b_5$  přijímá elektron z NADPH:CYP reduktasy. Přenos elektronu z cyt  $b_5$  na CYP je rychlejší než z NADPH:CYP reduktasy na CYP. **Druhý** předpokládaný mechanismus není založen na katalytickém působení cyt  $b_5$ , ale na allosterickém. **Cyt  $b_5$  vystupuje jako efektor** a nezáleží na tom, jestli obsahuje hemovou skupinu nebo ne (apo-cyt  $b_5$ ) (Yamazaki et al., 1996; Porter, 2002). **Třetí** hypotéza popisuje, že **cyt  $b_5$  tvoří s CYP komplex**, který umožňuje přijmout dva elektrony v jednom kroku od NADPH:CYP

reduktasy. **Poslední** variantou je, že se cyt  $b_5$  chová jako **pozitivní modifikátor monooxygenas**. Přítomnost cyt  $b_5$  v MFO systému způsobí, že se sníží počet rozpojení komplexu se superoxidovým anionradikálem, tím se sníží spotřeba NADPH a zvýší se množství produktu (Schenkman a Jansson, 2003).

### **3.Cíl disertační práce**

Cílem předkládané disertační práce bylo studium funkce systému oxidas se smíšenou funkcí s cytochromem P450 v metabolismu cizorodých látek. Hlavními cíli předkládané práce bylo rozšíření současných znalostí v oblasti metabolismu protinádorového léčiva ellipticinu a karcinogenního environmentálního polutantu benzo[a]pyrenu. Zvláštní zřetel byl kladen na poznání, které enzymy, a jakým mechanismem, působí v metabolismu těchto obou xenobiotik. Ke studiu aktivačních a detoxikačních reakcí ellipticinu a benzo[a]pyrenu *in vitro* a *in vivo* bylo využito několika přístupů.

Za využití potkaního modelu byl studován vliv ellipticinu na expresi a aktivitu jednotlivých složek MFO systému v cílových orgánech metabolismu ellipticinu. Současně byl sledován vliv ellipticinu a míra jeho cytotoxicity na různé nádorové buněčné linie. Součástí této komplexní studie byla také příprava „orfánového“ cytochromu P450 2S1 heterologní expresí, analýza jeho schopnosti metabolisovat BaP a ellipticin a přispět tak k „deorfánisaci“ (poznání funkce) tohoto proteinu. Dalším cílem bylo připravit protilátku proti tomuto proteinu, která by mohla sloužit jako diagnostický nástroj pro imunodetekci tohoto CYP v nádorových tkáních.

Za využití myšího modelu byl studován vliv zánětu plic na metabolismus environmentálního karcinogenu benzo[a]pyrenu. Cílem této studie bylo prozkoumat, jak zánět plic mění genotoxicitu BaP a jaké konkrétní mechanismy jsou zapojeny do této metabolické aktivity.

## **4.Materiál a metody**

Materiál a metody používaný při vypracování této disertační práce jsou detailně popsány v publikacích, které tvoří součást práce a jsou uvedeny jako *přílohy 1-7*. Pro přehlednost jsou v této kapitole disertační práce tyto metody stručně zmíněny a případně doplněny odkazy na odpovídající literaturu.

Mikrosomální a cytosolární frakce orgánů laboratorních potkanů (kmen Wistar), kteří byly premedikováni ellipticinem nebo BaP nebo Sudanem I, byly izolovány frakční centrifugací a charakterizovány z hlediska obsahu proteinu a u mikrosomů také koncentrace CYP. Pro naše experimenty byli potkani premedikováni intraperitoneálně (i.p.) ellipticinem v dávce 4 nebo 40 mg/kg tělesné hmotnosti; gaváží per os (p.o.) benzo[a]pyrenem v dávce 150 mg/kg tělesné hmotnosti; i.p. Sudanem I v dávce 20 mg/kg tělesné hmotnosti. Kontrolním zvířatům byla podána pouze rozpouštědla pro jednotlivé sloučeniny (ellipticin-1% kyselina octová; BaP-slunečnicový olej, Sudan I-kukuřiční olej). Pro studium vlivu zánětu plic vyvolaného lipopolysacharidem (LPS) na genotoxicitu BaP *in vivo* byly využity myši kmene C57B16 (*Charles River Laboratories, USA*). Myši byly vystaveny intranasálně LPS (*Escherichia coli*, serotyp O55:B5) (20 mg/myš) a/nebo intratracheálně BaP (0.5 mg/myš). Kontrolním zvířatům byla podána pouze rozpouštědla (LPS-solný roztok; BaP-tricaprylin).

Pro posouzení plicního zánětu, byly bronchoalveolární laváže odebrány zánětlivé buňky v plicích myši (Holand et al., 2014) a pro posouzení histopatologie plicní tkáně byly odebrány plicní řezy (Arlt et al., 2011) (experiment proveden Dr. Arltem, *King's college, UK*).

Buněčné nádorové linie (HL-60, CCRF-CEM, U87MG, BHT-101, B-CPAP, 8505-C, UKF-NB-3, UKF-NB-4 a MCF-7) byly pěstovány za použití standardních kultivačních medií (DMEM, EMEM, RIPA) a podmínek doporučených výrobcem a použitých v předchozích studiích (Bořek-Dohalská et al., 2004; Poljaková et al., 2007, 2011; Martínková et al., 2009).

Metabolismus ellipticinu, BaP a Sudanu I *in vitro* byl sledován za použití výše uvedených potkaních a myších mikrosomálních frakcí a rekombinantních cytochromů P450. Metabolity byly následně separovány pomocí HPLC.

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí sady Pierce® Microplate BCA Protein Assay Kit od firmy *Thermoscientific (USA)* metodou dle (Smith et al., 1985). Obsah cytochromu P450 v preparátech byl stanoven za využití charakteristické absorpce komplexu tohoto proteinu v redukovaném stavu s oxidem uhelnatým při 450 nm (Omura a Sato, 1964).



Aktivity cytochromů P450 1A1/2 v mikrosomech byly sledovány fluorimetricky metodou dle (Burke a Mayer, 1974; Burke et al., 1994), jako ethoxyresorufin-*O*-deethylace (EROD) (CYP1A1/2) a methoxyresorufin-*O*-demethylace (MROD) (CYP1A2). Aktivita CYP1A1 byla také stanovena s 3-cyano-7-ethoxy-kumarinem (CEC) jako substrátem. Aktivita CYP3A byla měřena jako 6- $\beta$ -hydroxylace testosteronu (Bořek-Dohalská et al., 2001). Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktasy bylo provedeno měřením rychlosti redukce cytochromu c (Sottocasa et al., 1967). Aktivita NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy (NQO1) byla stanovena spektrofotometricky při 550 nm s využitím menadionu jako substrátu dle (Ernster, 1967) a modifikována přidavkem cytochromu c dle (Mizerovská et al., 2011).

Expresy cytochromů P450 (1A1, 1B1, 2B1, 2S1, 2E, 3A4, 2W1), peroxidas (laktoperoxidasa, thyroïdperoxidasa, cyklooxygenasa), CPR a cytochromu b<sub>5</sub> v potkaních nebo myších mikrosomech a buněčných lyzátech byla sledována metodou „Western blot“. Imunodetekce byla provedena za použití polyklonálních protilátek proti těmto proteinům. Intenzita zón ilustrujících množství enzymu byla kvantifikována programem ImageJ nebo ELFOMAN 2.0. Obsah MPO byl sledován průtokovou cytometrií za použití anti-lidské MPO-FITC protilátky (Poljaková et al., 2007) (experiment proveden RNDr. J. Poljakovou, Ph.D. *PřF UK*). Obsah cytochromu b<sub>5</sub> byl také stanoven spektrofotometricky metodou dle (Strittmatter a Velick, 1956; Estabrook a Werringloer, 1978).

Pro studium genové exprese *CYP1A*, *1B1* a cytochromu b<sub>5</sub> byla využita metoda reverzní transkripce polymerázové řetězové reakce (RT-PCR) za použití TaqMan Universal PCR Master Mix a TaqMan Gene Expression Assay Mix (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*).

DNA pro analýzu aduktů byla izolována fenol-chloroformovou extrakcí. Analýza aduktů s DNA byla provedena prof. RNDr. M. Stiborovou, DrSc. na spolupracujícím pracovišti v *Německém centru pro výzkum rakoviny v Heidelbergu* metodou „<sup>32</sup>P-postlabeling“. Detaily jsou popsány v pracích (Bieler et al., 1997; Mei et al., 2006; Phillips a Arlt, 2007). Schopnost opravy DNA (nucleotide excision repair – NER) a eliminace DNA-BPDE aduktů byla měřena za použití modifikovaného „kometového testu“ (angl. comet assay) (experiment proveden Dr. Arltem, *King's college, UK*) (Langie et al., 2006).

Selekce peptidů pro přípravu protilátky proti CYP2S1 byla provedena za pomoci ExpASy serveru a vyhodnocena on-line na serveru Invitrogen PeptideSelect™ (<http://rnaidesigner.lifetechnologies.com/peptide/design.do>) prof. Hodkem (*Univerzita*

Karlova v Praze). Vybrané peptidy byly připraveny společností VIDIA (Jesenice, ČR) a byly použity k imunizaci slepic.

Frakce IgY byla připravena z vaječných žloutků metodou dle práce (Hodek et al., 2013a). Roztok anti-peptidové protilátky IgY-CYP2S1 byl purifikován afinitní chromatografií. Imunoreaktivita připravené protilátky byla testována pomocí ELISA (angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

Cytochrom P450 2S1 byl připraven heterologní expresí v *E. coli* (Wu et al., 2006). Buňky *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  s genem pro lidskou formu CYP2S1 byly získány jako dar prof. F. P. Guengericha (*Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, USA*). Podmínky exprese tohoto proteinu byly optimalizované, aby bylo dosaženo vyšších výnosů při produkci CYP2S1. Membránová frakce byla získána frakční centrifugací. Solubilizovaný roztok membránové frakce byl purifikován afinitní chromatografií pomocí Ni-NTA agarosy. Enzymová aktivita purifikovaného CYP2S1 byla analyzována ve dvou uspořádáních. V prvním byl připraven rekonstituovaný liposomální systém s CPR a CYP2S1. Ve druhém uspořádání, byla připravena inkubační směs, kde byl kromě CYP2S1 přítomen také peroxid vodíku nebo kumoylhydroperoxid.

Lidská forma CYP1A1, 1B1 a CPR byla připravena heterologní expresí v *E. coli* J. Milichovským (*katedra biochemie, PřF UK*) postupem popsáním v práci (Milichovský et al., 2016).

Identifikace rekombinantního proteinu cytochromu P450 2S1 byla provedena hmotnostní spektrometrií. Hmotnostní analýza byla provedena doc. RNDr. M. Šulcem, Ph.D. na MALDI-TOF/TOF ultra FLEX III hmotnostním spektrometru *Bruker-Daltonics (SRN)*.

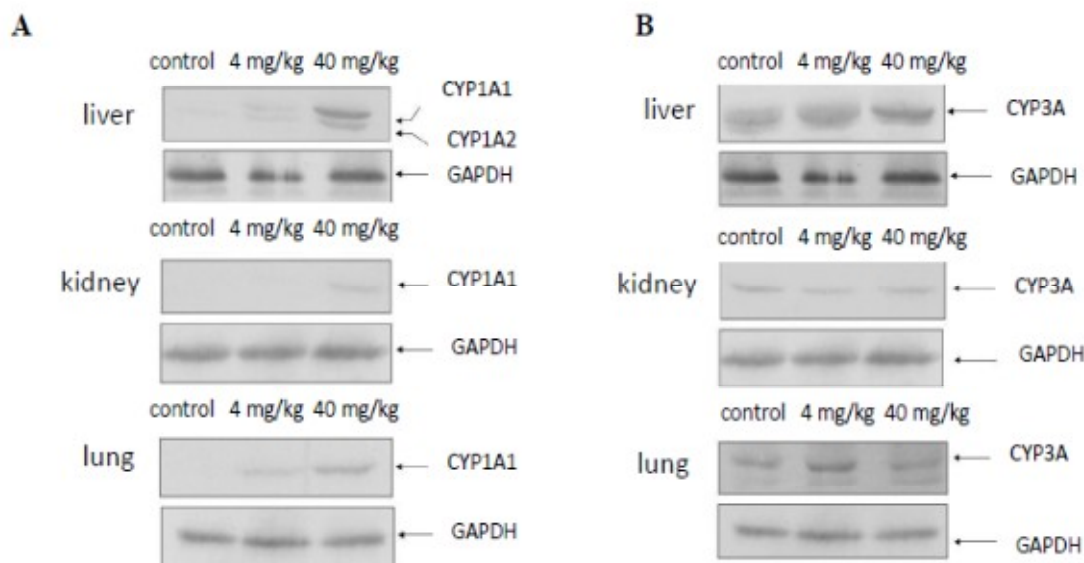
## **5. Výsledky a diskuse**

### 5.1 Protinádorové léčivo ellipticin indukuje cytochromy P450 1A1, 1A2 a 3A, cytochrom b<sub>5</sub> a NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu v játrech, ledvinách a plicích potkana – publikace č. 1

Tyto výsledky byly publikovány v časopise *International Journal of Electrochemical Science* (příloha č. 1): Iveta Vranová, Michaela Moserová, Petr Hodek, René Kizek, Eva Frei, Marie Stiborová: The anticancer drug ellipticine induces cytochromes P450 1A1, 1A2 and 3A, cytochrome b<sub>5</sub> and NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase in rat liver, kidney and lung. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 8 (2013) 1586 – 1597.

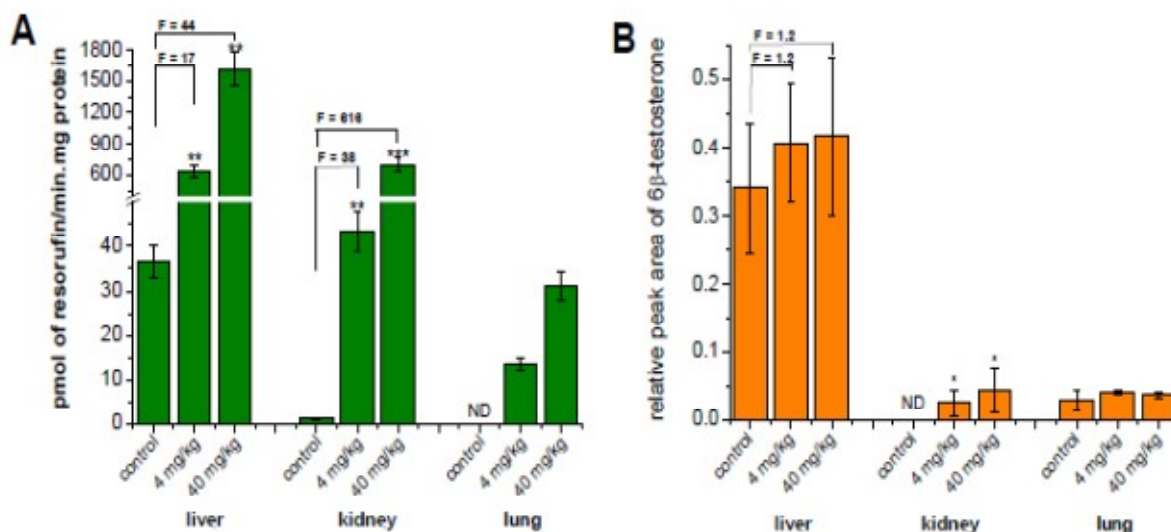
Pro studium metabolismu ellipticinu a určení enzymů, které na tomto metabolismu participují *in vivo*, jsme v této práci využili jako modelový organismus laboratorního potkana. Konkrétně byl studován efekt tohoto protinádorového léčiva na množství a aktivitu cytochromů P450 (CYP1A1/2, CYP3A) a dalších složek MFO systému (CPR, cyt b<sub>5</sub>) v mikrosomech izolovaných z jater, ledvin a plic laboratorního potkana. Kromě toho byla analyzována schopnost těchto enzymů metabolizovat ellipticin na aktivační a/nebo detoxikační metabolity *in vitro*.

V práci byly potvrzeny poznatky z dřívějších publikací, kde bylo popsáno, že ellipticin indukuje expresi CYP1A1/2 v potkaních (Aimová et al., 2007) a v lidském organismu (Stiborová et al., 2003b) na úrovni proteinu a katalytické aktivity. Z obrázku 15A je patrné, že ellipticin je schopný indukovat expresi CYP1A1 a 1A2 v játrech, ledvinách i plicích použitého experimentálního modelu. Zvýšení exprese proteinů CYP1A podrodiny, které je závislé na dávce ellipticinu, koreluje se zvýšením jejich katalytické aktivity (EROD) (Obrázek 15A a 16A). Nejvyšší zastoupení a katalytická aktivita CYP1A1/2 byla nalezena v játrech potkanů premedikovaných 40 mg/kg ellipticinu. Stejný výsledek byl zaznamenán i v extrahepatálních tkáních (ledviny, plíce). Již v dřívější práci byla také popsána indukce CYP1A1/2 na úrovni mRNA (Aimová et al., 2007).



**Obrázek 15:** Western blot CYP1A a CYP3A v mikrosomech izolovaných z jater, ledvin a plic kontrolních a ellipticinem premedikovaných (4 nebo 40 mg/kg) potkanů. Použité protilátky proti CYP1A1 (A) a CYP3A (B), jako kontrola množství aplikovaných proteinů byla použita detekce proteinu glyceralddehyd-3-fosfátdehydrogenasy (GAPDH). Překlad anglického názvosloví (liver-játra, kidney-ledviny, lung-plíce).

Poljaková et al., ve své práci zjistila, že ellipticin indukuje kromě CYP1A i mRNA a protein CYP3A4 v několika nádorových buněčných liniích (Poljaková et al., 2011). Proto bylo i v této práci rovněž analyzováno množství a katalytická aktivita potkaní orthologní formy CYP3A. Vedle exprese CYP1A1/2 byla v játrech premedikací zvířat ellipticinem indukována exprese proteinu CYP3A (Obrázek 15B). Zvýšená exprese CYP3A v játrech odpovídá katalytické aktivitě tohoto enzymu, která byla měřena tzv. "markerovou" reakcí CYP3A, hydroxylací testosteronu za vzniku 6- $\beta$ -hydroxytestosteronu. Naproti tomu v ledvinách potkaního modelu docházelo účinkem ellipticinu k represí exprese CYP3A a stejně tak i v plicích potkanů vystavených vyšší dávce ellipticinu (40 mg/kg). Se zvyšující dávkou ellipticinu se aktivita CYP3A zvyšovala, nicméně nárůst této enzymové aktivity ve všech sledovaných orgánech nebyl statisticky významný (Obrázek 16B).

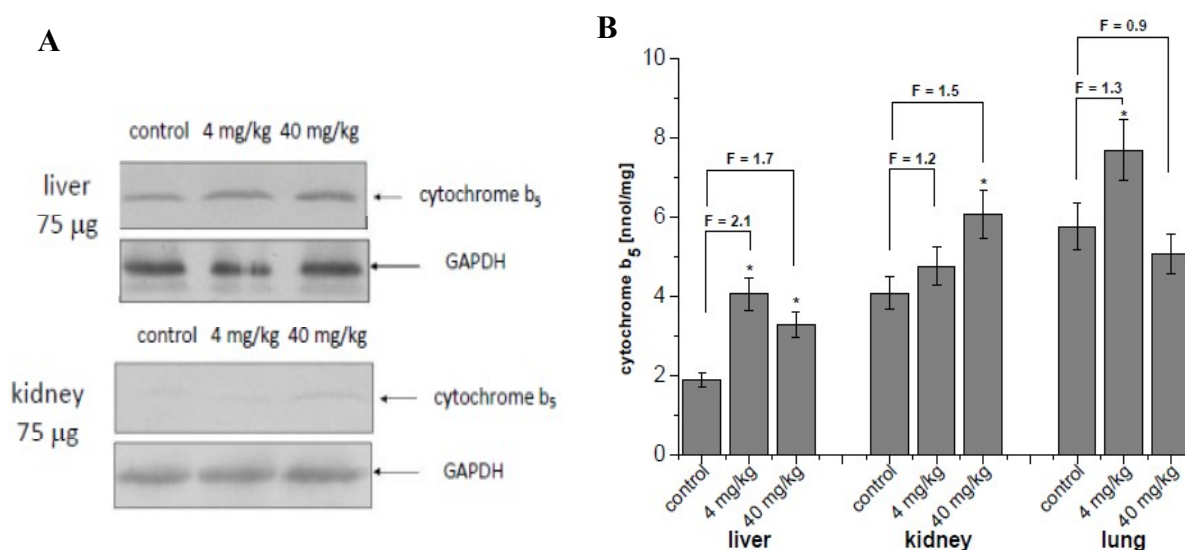


**Obrázek 16:** Aktivita CYP1A měřena jako EROD (7-ethoxyresorufin *O*-deethylace) (A) a enzymová aktivita CYP3A měřena stanovením vzniku 6- $\beta$ -hydroxytestosteronu (B) v mikrosomech kontrolních potkanů a zvířat premedikovaných ellipticinem (ND – nedetekováno, F-násobek nárůstu). Hodnoty signifikantně odlišné od kontrol: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (Student's t-test) Překlad anglického názvosloví (liver-játra, kidney-ledviny, lung-plíce).

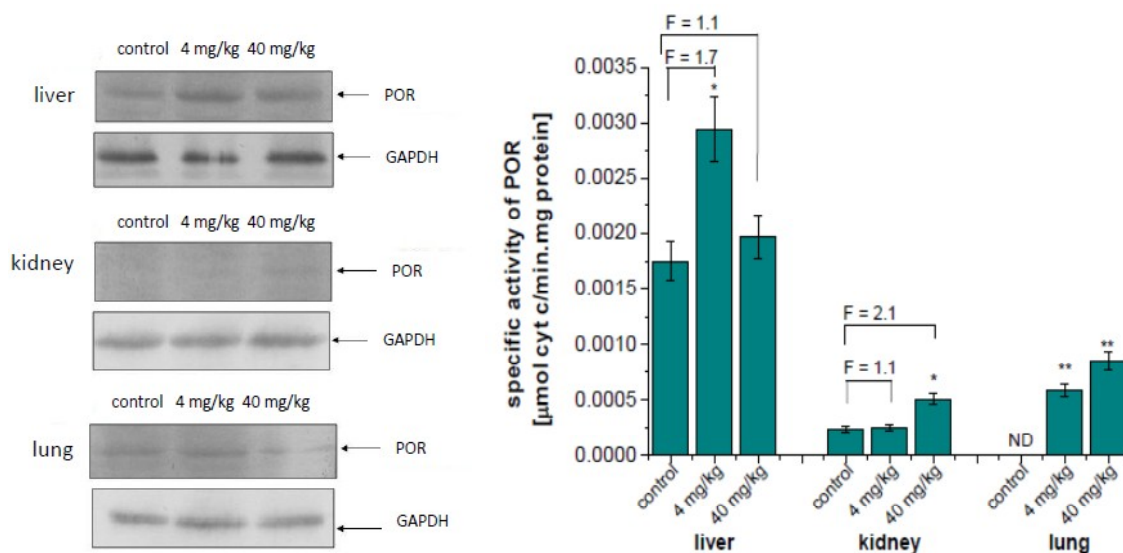
Pro ucelený obraz jak ellipticin ovlivňuje jednotlivé složky MFO systému, byla v této práci analyzována rovněž exprese cytochromu  $b_5$  a CPR. Zvýšená exprese cyt  $b_5$  byla zaznamenána metodou Western blot ve vzorcích jater a ledvin premedikovaných zvířat (Obrázek 17A). Míra exprese se zvyšovala se zvyšující se dávkou ellipticinu. V plicích testovaných zvířat tento protein nebyl detekován. Naproti tomu, při využití spektrofotometrických vlastností cyt  $b_5$  bylo touto analýzou zjištěno, že v plicích je až 3 krát vyšší obsah cytochromu  $b_5$  než v ledvinách nebo játrech (Obrázek 17B). Tento rozdíl může být způsoben na jedné straně horší dostupností epitopu tohoto proteinu protilátce nebo na straně druhé, z důvodu přítomnosti určitého inhibitoru, který potlačuje interakci protein-protilátka. Jako třetí důvod rozdílu v obsahu cyt  $b_5$  při měření jednotlivými metodami se zdá „nesprávné prostorové uspořádání“ tohoto proteinu. Obsah cytochromu  $b_5$ , který neobsahuje hem (apo-forma) nebo nezaujímá nativní konformaci, není možný stanovit spektrofotometricky.

Pro správné fungování MFO systému je nezbytná funkce NADPH:cytochrom P450 reduktasy. Ovlivnění jejího množství a katalytické aktivity má vliv na fungování celého MFO systému. Proto bylo nutné prozkoumat, jestli má ellipticin vliv i na tento enzym. Z výsledků je patrné, že kromě jater premedikovaných zvířat nemá ellipticin na obsah ani

katalytickou aktivitu zásadní vliv. V ledvinách a plicích se po premedikaci ellipticinem obsah a aktivita této reductasy mění jen minimálně (*Obrázek 18 A/B*).

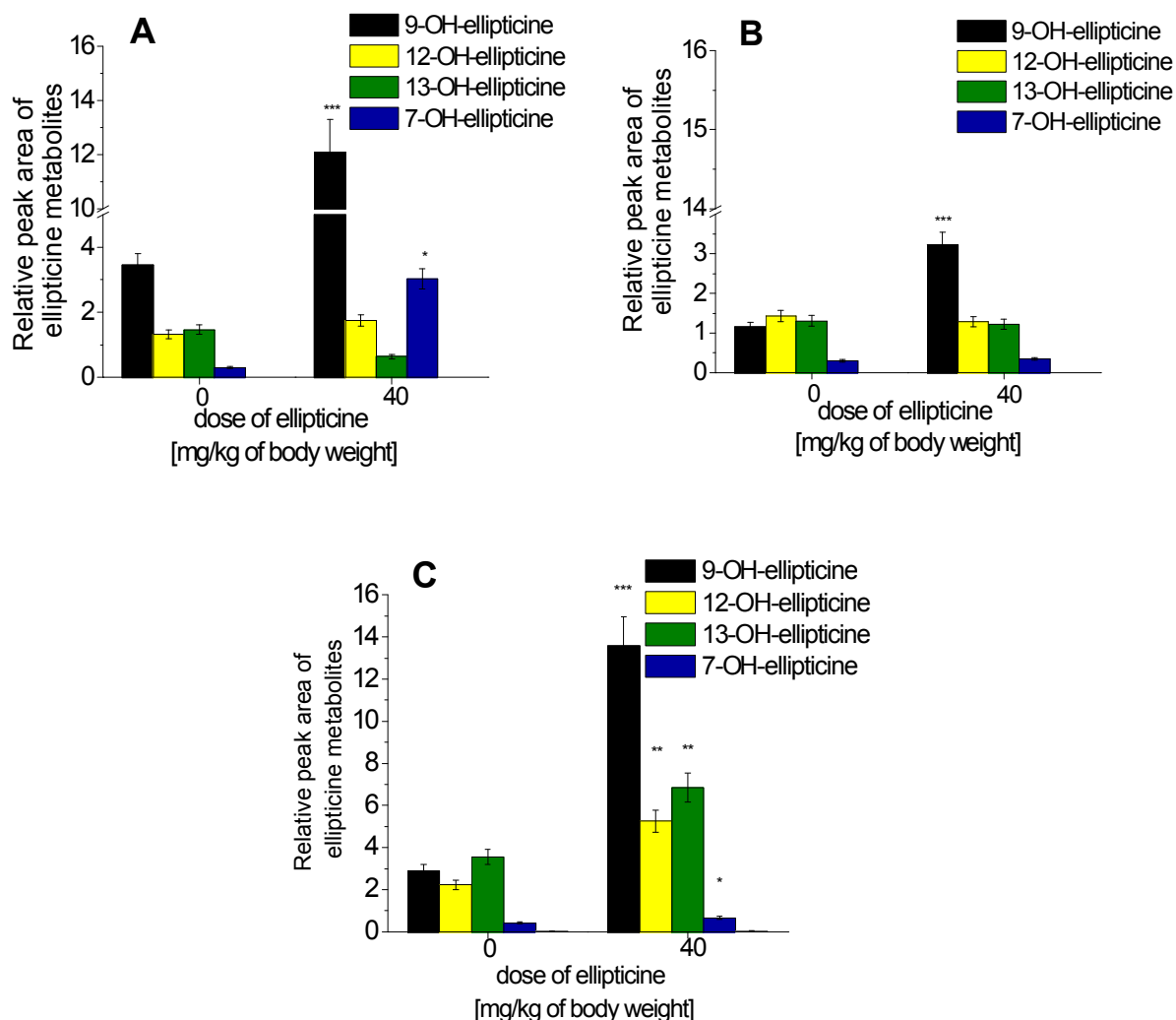


**Obrázek 17:** Detekce cytochromu  $b_5$  metodou Western blot (**A**) a spektrofotometricky (**B**). Mikrosomy izolované z orgánů potkana kontrolního a premedikovaného ellipticinem (4 nebo 40 mg/kg). Jako kontrola množství aplikovaných proteinů byla použita detekce proteinu GAPDH. Hodnoty signifikantně odlišné od kontrol: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (Student's t-test). (F-násobek nárůstu). Překlad anglického názvosloví (liver-játra, kidney-ledviny, lung-plíce).



**Obrázek 18:** Detekce NADPH:cytochrom P450 reductasy metodou Western blot (**A**) a aktivita CPR měřená metodou redukce cytochromu c (**B**). Mikrosomy izolované z orgánů potkana kontrolního a premedikovaného ellipticinem (4 nebo 40 mg/kg). Jako kontrola množství aplikovaných proteinů byla použita detekce proteinu GAPDH. Hodnoty signifikantně odlišné od kontrol: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (Student's t-test). (ND – nedetekováno, F-násobek nárůstu). Překlad anglického názvosloví (liver-játra, kidney-ledviny, lung-plíce).

Oxidace ellipticinu byla v diskutované publikaci (Vranová et al., 2013, *příloha č. 1*) sledována za použití potkaních jaterních, ledvinných a plicních mikrosomů. Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie bylo zaznamenáno 5 metabolitů: 7-hydroxy-, 9-hydroxy-, 12-hydroxy a 13-hydroxyellipticin a N<sup>2</sup>-oxid ellipticinu, který nebyl v této studii kvantifikován, protože může podléhat spontánní přeměně na 12-hydroxyellipticin (Obrázek 19).



**Obrázek 19:** Metabolismus ellipticinu mikrosomy potkana izolovaných z ledvin (A), plic (B) a jater (C) kontrolních zvířat a premedikovaných ellipticinem (40 mg/kg). Množství metabolitů jsou průměry třech měření  $\pm$  směrodatná odchylka. Hodnoty signifikantně odlišné od kontrol: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (Student's t-test). (ND – nedetekováno, F-násobek nárůstu).

Ve všech testovaných orgánech zvířat vystavených působení ellipticinu (40 mg/kg) byl metabolit 9-hydroxyellipticin zastoupen v nejvyšší míře. Podobně i 7-



hydroxyellipticin byl tvořen ve vyšší míře ve vzorcích jater a ledvin premedikovaných ellipticinem oproti kontrolním zvířatům. Z předchozích studií je známo (Stiborová et al., 2004a; Kotrbová et al., 2011), že na tvorbě těchto dvou metabolitů participuje CYP1A1/2 a jak bylo zmíněno již výše, CYP1A1 byl indukován ve všech třech orgánech vystavených působení ellipticinu.

V jaterních mikrosomech bylo zaznamenáno až dvounásobné zvýšení tvorby „aktivačních“ metabolitů 13-hydroxy- a 12-hydroxyellipticinu, které vedou ke tvorbě aduktů s DNA (*Obrázek 19C*). Tento jev je pravděpodobně způsoben nejen silnou indukcí CYP1A1/2, ale také indukcí CYP3A (*Obrázek 15B*) a cytochromu b<sub>5</sub> (*Obrázek 17A*) v jaterních mikrosomech. Zdá se, že indukce cyt b<sub>5</sub> má zásadní vliv na aktivitu CYP, které přeměňují ellipticin na aktivační metabolity. Tento protein totiž mění poměr jednotlivých metabolitů ellipticinu tvořených CYP1A1/2 či CYP3A ve prospěch aktivačních metabolitů 12-hydroxy a 13-hydroxyellipticinu (Kotrbová et al., 2011; Stiborová et al., 2012). Proto má vyšší exprese cytochromu b<sub>5</sub> (*Obrázek 17A*) v játrech za následek zvýšenou i tvorbu 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu při oxidaci ellipticinu potkaními jaterními mikrosomy.

Na rozdíl od jaterních mikrosomů, nebylo v plicích ani ledvinných vzorcích vystavených ellipticin, zaznamenáno žádné zvýšení v tvorbě 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu (*Obrázek 19A/B*). V těchto orgánech byla zvýšená produkce pouze detoxifikačních metabolitů 7-hydroxy- a 9-hydroxyellipticinu. Tyto výsledky jsou důsledkem jak efektivní indukce CYP1A1 zprostředkované ellipticinem tak nižším indukčním účinkem na hladinu exprese CYP3A a cyt b<sub>5</sub> v těchto tkáních (porovnej *Obrázek 15 a 17*).

Výsledky prezentované v uvedené publikaci (Vranová et al., 2013, *příloha č. 1*) plně prokazují, že potkaní cytochromy CYP1A1/2, CYP3A a cytochrom b<sub>5</sub> jsou zodpovědné jak za aktivaci ellipticinu vedoucí k tvorbě aduktů s DNA, tak také za tvorbu detoxikačních metabolitů. Navíc bylo prokázáno, že množství a aktivita těchto proteinů je indukována samotným ellipticinem. Ellipticin tak může modulovat svůj vlastní metabolismus v potkaním organismu, čímž ovlivňuje svůj vlastní farmakologický a/nebo genotoxický potenciál.

**Podíl disertantky na prezentované publikaci:** Isolace mikrosomálních frakcí z orgánů zvířat, jejich charakterizace a stanovení aktivit enzymů v těchto frakcích pomocí

specifických markerových substrátů. Stanovení exprese proteinů v těchto mikrosomálních frakcích metodou „Western blotting“. Studium oxidačních reakcí ellipticinu s potkaními mikrosomy pomocí HPLC. Vyhodnocení experimentálních dat a jejich statistické zpracování. Participace na přípravě publikace.

## 5.2 Exprese enzymů metabolisujících protinádorové léčivo ellipticin, stanovené elektromigračními metodami, ovlivňují jeho cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám – srovnávací studie – *publikace č. 2*

Tyto výsledky byly publikovány v časopise *International Journal of Electrochemical Science* (*příloha č. 2*): Marie Stiborová, Jitka Poljaková, **Iveta Mrízová**, Lucie Bořek-Dohalská, Tomáš Eckschlager, Vojtěch Adam, René Kizek, Eva Frei: Expression levels of enzymes metabolizing an anticancer drug ellipticine determined by electromigration assays influence its cytotoxicity to cancer cells - a comparative study. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 9 (2014) 5675 – 5689.

Další publikace, která tvoří součást předkládané disertační práce je, přehledem výsledků z dřívějších prací doplněných o nové výsledky. Tento přehled shrnuje informace o expresi jednotlivých enzymů (CYP a peroxidasy), které katalyzují a/nebo ovlivňují metabolismus ellipticinu, v nádorových buněčných liniích, které jsou sensitivní vůči ellipticinu. S využitím testu stanovení životnosti buněk pomocí tzv. MTT testu byla vyhodnocena cytotoxicita ellipticinu vůči jednotlivým testovaným nádorovým liniím a je diskutována ve vztahu ke schopnosti ellipticinu tvořit kovalentní adukty s DNA.

Metodou Western blot byla sledována exprese CYP1A1, 1B1, 3A4, laktoperoxidasy, thyridperoxidasy, cyklooxygenasy-1 a cytochromu b<sub>5</sub>, enzymů a proteinů, které katalyzují a/nebo ovlivňují metabolismus ellipticinu v následujících nádorových buňkách:

- lidské leukemické buňky **HL-60**,
- lidské leukemické T-buňky **CCRF-CEM**,
- buňky glioblastomu **U87MG**,
- buňky papilárního karcinomu štítné žlázy **B-CPAP** a **BHT-101**,
- buňky anaplastického karcinomu štítné žlázy **8505-C**,
- buňky neuroblastomu **UKF-NB-3** a **UKF-NB-4**,
- buňky prsního adenokarcinomu **MCF-7**.

V buněčných nádorových liniích HL-60 a CCRF-CEM byly exprimovány peroxidasy LPO a COX-A, v HL-60 byla navíc potvrzena přítomnost MPO. Vedle peroxidasy byl v těchto nádorových buňkách exprimován pouze CYP1A1, exprese CYP1B1 ani CYP3A4 nebyla prokázána (Poljaková et al., 2007).

V buňkách glioblastomu byly kromě peroxidasy LPO a COX-1 exprimovány i CYP1A1, CYP1B1 a CYP3A4. Vzhledem k tomu, že exprese několika těchto CYP je indukována ellipticinem (Aimová et al., 2007; Vranová et al., 2013 - příloha č. 1), byla tato potencionální změna exprese po vystavení ellipticinu sledována nejden ve výše uvedených buněčných liniích, ale i v buňkách U87MG. V těchto buňkách ellipticin indukuje CYP1B1, CYP3A4 a CYP1A1 (Martínková et al., 2009).

V buněčných liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4 byl kromě peroxidasy (LPO, COX-1) a cytochromů P450 (CYP1A1, CYP1B1 a CYP3A4) detekována rovněž exprese cytochromu b<sub>5</sub>. Po vystavení těchto buněk ellipticinu bylo zjištěno, že vedle indukce CYP1A1 a CYP3A4 došlo k represi exprese CYP1B1, LPO a COX-1. Cytochrom b<sub>5</sub> byl indukován pouze v buňkách UKF-NB-3 (Poljaková et al., 2011).

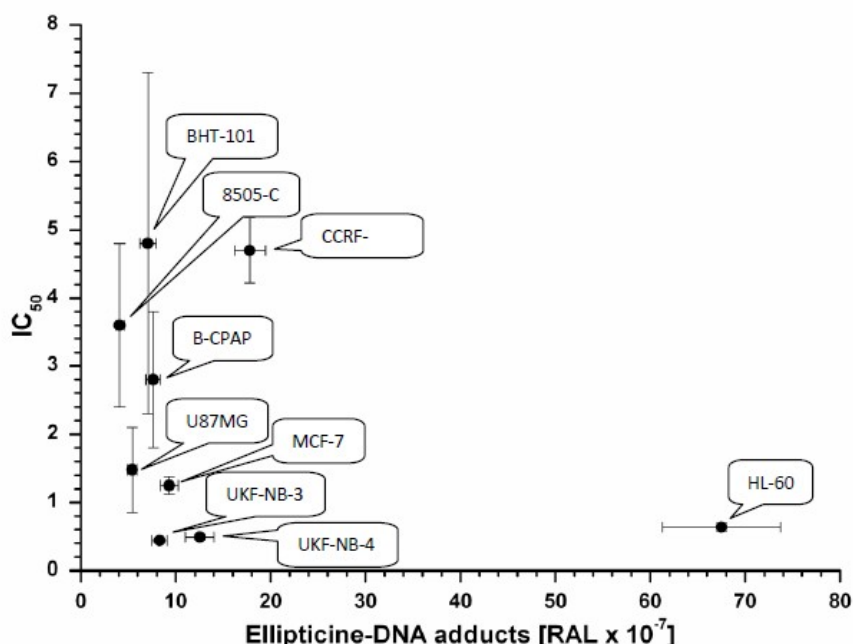
V případě buněčných linií nádorů štítné žlázy B-CPAP, 8505-C a BHT-101 byla detekována peroxidasa COX-1 a TPO, která je specifická pro tento typ buněk. Tato peroxidasa byla však exprimována v menší míře než COX-1. Dále byla detekována exprese proteinů CYP1A1, CYP1B1, CYP3A4 a cytochromu b<sub>5</sub>. Po vystavení těchto buněk působení ellipticinu byla prokázána indukce CYP1A1, a to ve všech liniích, zatímco indukce CYP3A4 byla zjištěna jen v buňkách B-CPAP. V případě CYP1B1, COX-1 a cyt b<sub>5</sub> byla zaznamenána jejich nižší exprese než v buňkách, které nebyly vystaveny působení ellipticinu (Poljaková et al., 2013).

Buněčná linie prsního nádoru MCF-7, která byla použita v tomto experimentu, vykazovala expresi CYP1A1, CYP1B1 a CYP3A4. Expresi peroxidasy nebyla zkoumána. Indukce ellipticinem byla zaznamenána pouze v případě CYP1B1. Navíc bylo prokázáno, že míra indukce CYP1B1 byla vyšší, když byla tato nádorová linie vystavena nejdříve nižší koncentraci ellipticinu (0.1  $\mu$ M, 24 hod), a pak po dobu 72 hodin vystavena působení 2.5  $\mu$ M nebo 5  $\mu$ M roztoku ellipticinu.

Vystavení nádorových buněčných linií působení ellipticinu, které exprimují CYP a/nebo peroxidasy má za následek vznik kovalentních aduktů ellipticinu s DNA, a to aduktů stejných s těmi, které byly nalezeny v experimentech s potkaním organismem *in vivo* (Aimová et al., 2007). Ve všech testovaných nádorových buňkách vznikaly 2 hlavní adukty s DNA, které jsou generované z aktivačních metabolitů 13-hydroxy- a 12-hydroxyellipticinu. V některých liniích vznikali ještě další dva minorotní adukty s DNA, jejichž struktura však nebyla doposud blíže charakterizována.

Cytotoxicita ellipticinu, vyjádřená jako hodnota IC<sub>50</sub>, je rozdílná pro různé testované buněčné linie a koreluje s množstvím ellipticinových aduktů s DNA ve většině buněk.

Obyčejně lze říci, že vyšší produkce aduktů s DNA má za následek vyšší cytotoxicitu tohoto léčiva vůči většině testovaných nádorových linií (Obrázek 20). Z toho vyplývá, že kovalentní modifikace DNA ellipticinem hraje důležitou roli v toxicitě ellipticinu vůči těmto buňkám.



**Obrázek 20:** Vztah mezi obsahem ellipticinových aduktů s DNA a hodnotami IC<sub>50</sub> pro ellipticin v nádorových buněčných liniích HL-60, CCRF-CEM, U87MG, B-CPAP, BHT-101, 8505-C, UKF-NB-3/4 a MCF-7.

Jak bylo ukázáno v této práci, toxický efekt ellipticinu vyvolaný vznikem kovalentních aduktů s DNA je závislý na expresi CYP1A1, 1B1, 3A4 u většiny linií a peroxidas COX-1 a MPO v některých buněčných liniích (HL-60 versus CCRF-CEM). Navíc vedle bazálních hladin exprimovaných enzymů, může být dalším faktorem ovlivňujícím vznik aduktů s DNA a cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám, rovněž indukční efekt ellipticinu na expresi těchto enzymů. Jako příklad může posloužit indukce CYP1B1 po vystavení buněčné linie MCF-7 nejdříve menším dávkám ellipticinu a pak její následnému zvýšení. Cytotoxicita ellipticinu v MCF-7 byla vyšší oproti cytotoxicitě linie, která byla pěstována ve vyšší koncentraci jedné ellipticinu, a korelovala s vyšším množstvím tvořených aduktů s DNA.

Pouze v případě buněčné linie UKF-NB-3, která, i když obsahovala nižší množství aduktů s DNA než linie UKF-NB-4, byla srovnatelně citlivá vůči ellipticin. V tomto

případě tedy musí být brány v úvahu i jiné mechanismy působení ellipticinu (interkalace do DNA, vznik reaktivních forem kyslíku, které vznikají při oxidaci ellipticinu), které mohou rovněž přispívat k cytotoxicitě ellipticinu v UKF-NB-3.

Tato publikovaná studie přispěla k detailnějšímu poznání mechanismu účinku ellipticinu v nádorových buňkách. Z výsledků je patrné, že hlavním mechanismem účinku ellipticinu ve většině nádorových buněčných liniích je tvorba kovalentních aduktů s DNA. Kromě toho je zřejmé, že ellipticin je schopný indukovat enzymy, které se podílí na jeho metabolické aktivaci za vzniku těchto aduktů s DNA a může tak zvýšit svou vlastní cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám. Tímto způsobem může toto protinádorové léčivo modulovat svůj vlastní metabolismus a farmakologické účinky.

**Podíl disertantky na prezentované publikaci:** Stanovení exprese proteinů metodou Western blot. MTT test. Kompletace výsledků a dat z literatury pro přípravu rešerše. Vyhodnocení experimentálních dat a jejich statistické zpracování. Participace na přípravě publikace.

### 5.3 Protinádorové léčivo ellipticin aktivované cytochromy P450 způsobuje poškození DNA, které determinuje jeho farmakologické účinky v experimentálních modelech potkanů a myši s deletovanou cytochrom P450 reduktasou v játrech (HRN<sup>TM</sup>) – publikace č. 3

Tyto výsledky byly publikovány v časopise *International Journal of Electrochemical Science* (příloha č. 3): Marie Stiborová, Věra Černá, Michaela Moserová, Iveta Mrízová, Volker M. Arlt, Eva Frei: The anticancer drug ellipticine activated with cytochrome P450 mediates DNA damage determining its pharmacological efficiencies: studies with rats, hepatic cytochrome P450 reductase null (HRN<sup>TM</sup>) mice and pure enzymes. *Int. J. Mol. Sci.*, 16 (2015) 284-306.

Publikace je souhrnným přehledem o ellipticinu, jeho metabolismu a enzymech, které katalyzují oxidaci tohoto protinádorového léčiva a zejména jeho působení na tyto enzymy v různých experimentech *in vitro* a *in vivo*. Tento přehled je zaměřený na porovnání dat získaných ve studiích využívajících experimentů *in vitro* a *in vivo* a ukazuje, že oba tyto přístupy jsou nezbytné pro získání validních informací o enzymech participujících na metabolismu ellipticinu. Část výsledků, ze kterých tento přehled vychází, byla detailně popsána již v předešlých komentářích k publikacím č. 1 a 2.

Ke studiím *in vitro* byly využity následující systémy: subcelulární frakce endoplasmatického retikula (mikrosomy), dále buněčné kultury exprimující CYP (příloha č. 2), izolované CYP rekonstituované s dalšími komponenty systému MFO (CPR, cyt b<sub>5</sub>) a rekombinantní CYP – lidské, potkaní, králičí a myší isoformy těchto enzymů. Studie *in vivo* byly provedeny za užití několika různých zvířecích modelů: (I) myší model označovaný jako HRN (hepatic cytochrome P450 reductase null), který má specificky „deletovaný“ gen pro NADPH:cytochrom P450 reduktasu v hepatocytech, jež je důležitým enzymem pro přenos elektronů k cytochromům P450 při jeho reakcích a kontrolní linie nepremedikovaných myši (WT – wild type); (II) stejný myší model, ve kterém byla exprese enzymů MFO systému indukována BaP a (III) model potkanů kmene Wistar (příloha č. 1).

Údaje shrnuté v tomto přehledu ukazují, že rostlinný alkaloid ellipticin může být považován za proléčivo, které tvoří po metabolické aktivaci kovalentní adukty s DNA v cílových tkáních jeho působení.

Adukty s DNA a ellipticinu jsou tvořeny jak ve zdravých tak i nádorových buňkách, důležitá je však skutečnost, že ve zdravých tkáních tyto adukty nepřetrvávají. Získaná data ukazují, že cytotoxické účinky ellipticinu v nádorových tkáních jsou dány (I) expresí CYP (a/nebo expresí peroxidas); (II) expresí cytochromu b<sub>5</sub>; a (III) vlastní schopností ellipticinu indukovat CYP1A1, CYP3A a cytochrom b<sub>5</sub> v nádorových buňkách.

Výsledky také ukazují, že zvířecí modely, ve kterých může být množství biotransformačních enzymů modulované jejich indukci nebo naopak represí, jsou vhodným nástrojem pro identifikaci enzymů odpovědných za aktivaci nebo detoxifikaci ellipticinu.

Vznik aduktů ellipticinu s DNA *in vivo* je závislý nejen na úrovni exprese CYP3A, který katalyzuje aktivaci ellipticinu také *in vitro*, ale také na expresi CYP1A, který ve studiích *in vitro* oxidoval ellipticin zejména na detoxifikační metabolity. Získané výsledky však ukazují, že cytochrom b<sub>5</sub> mění poměr metabolitů ellipticinu tvořených CYP1A1/2 a CYP3A tak, že zvyšuje tvorbu aktivačních metabolitů 12-hydroxy a 13-hydroxyellipticinu, které tvoří adukty s DNA. Ze studie vyplývá, že extrapolace dat ze studií *in vitro* na situaci *in vivo* není zcela možná, a proto je nutné využívat kombinace experimentů jak *in vitro* tak *in vivo*.

Výsledky shrnuté v této práci jsou základem pro další predikci citlivosti ellipticinu vůči nádorovým onemocněním a pro jeho využití v cílené léčbě například jako součást nanonosičů.

**Podíl disertantky na prezentované publikaci:** Isolace mikrosomálních frakcí z orgánů zvířat, jejich charakterizace a stanovení aktivit enzymů v těchto frakcích pomocí specifických markerových substrátů. Stanovení exprese proteinů v těchto mikrosomálních frakcích metodou „Western blotting“. Studium oxidačních reakcí ellipticinu s potkaními mikrosomy pomocí HPLC. Kompletace výsledků a dat z literatury pro přípravu rešerše. Vyhodnocení experimentálních dat a jejich statistické zpracování. Participace na přípravě publikace.



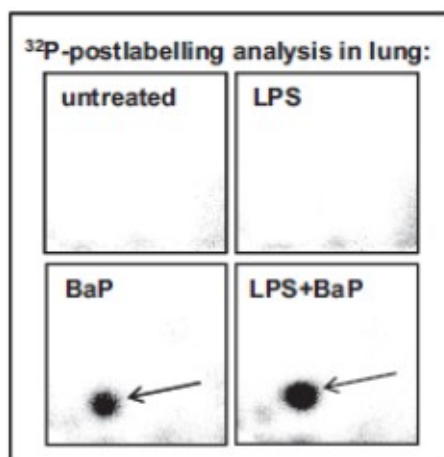
#### 5.4 Zánět plic ovlivňuje tvorbu aduktů DNA s karcinogením benzo[a]pyrenem aktivovaným cytochromem P450 1A1 v tomto orgánu – publikace č. 4

**Tyto výsledky byly publikovány v časopise *Toxicological Sciences* (příloha č. 4):** Volker M. Arlt, Annette M. Krais, Roger W. Godschalk, Yanira Riffo-Vasquez, **Iveta Mrízová**, Candice A. Roufosse, Charmaine Corbin, Shi Quan, Eva Frei, Marie Stiborová, Frederik-Jan van Schooten, David H. Phillips, and Domenico Spina: Pulmonary inflammation impacts on CYP1A1-mediated respiratory tract DNA damage induced by the carcinogenic air pollutant benzo[a]pyrene. *Tox. Sci.*, 146 (2015) 213-225.

V této publikaci, která je součástí komplexní studie vlivu polycyklických aromatických sloučenin na vznik a vývoj nádorových onemocnění plic, jsme se zaměřili na studium vlivu zánětu plic na metabolismus environmentálního karcinogenu benzo[a]pyrenu (BaP) *in vivo*. Cílem studie bylo zjistit, jak zánět plic mění genotoxicitu BaP a jaké konkrétní mechanismy jsou zapojeny do metabolické aktivace BaP.

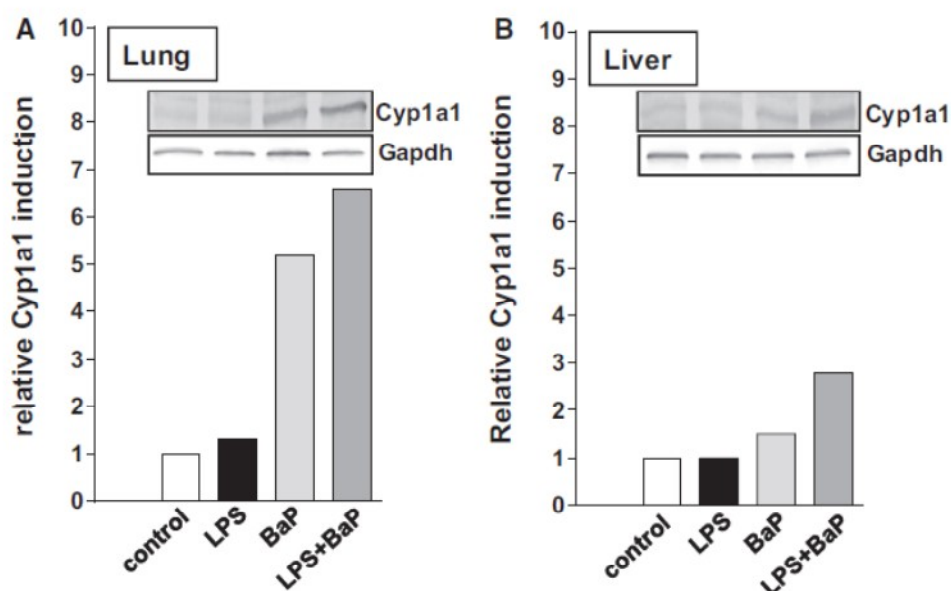
Vzhledem k předchozím studiím byl i v experimentech této studie použit model organismu myši. Zjištěno totiž bylo, že tento model je vhodný pro analýzu genotoxického efektu BaP *in vivo* (Arlt et al., 2008, 2012). K indukci plícního zánětu byl vybrán lipopolysacharid (LPS) (*Escherichia coli*, serotyp O55:B5), jehož účinky vyvolávající nealergenní zánět byly ověřeny již v předchozích studiích (Gungor et al., 2010; Moriya et al., 2012). Použitý model byl vystaven jednorázové dávce LPS a pak jedné dávce BaP.

Pro detekci aduktů s DNA byla opět použita metoda  $^{32}\text{P}$ -postlabeling. Adukt BaP s DNA, který byl pozorován u myši premedikovaných BaP (plíce a játra), byl identifikován jako 10-(deoxyguanosin- $\text{N}^2$ -yl)-7,8,9-trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydro-BaP (dG- $\text{N}^2$ -BPDE) (Arlt et al., 2008). Z výsledků uvedené studie je zřejmé, že adukty DNA s BaP jsou tvořeny v nejvyšší míře v plicích vystavených působení LPS/BaP. V tomto případě dochází k trojnásobnému zvýšení oproti tvorbě aduktů v plicích zvířat vystavených pouze BaP (Obrázek 21). V kontrolních vzorcích zvířat nepremedikovaných BaP a ve vzorcích tkání zvířat premedikovaných pouze LPS nebyla zaznamenána tvorba žádných aduktů s DNA (Obrázek 21).



**Obrázek 21:** Autoradiografie aduktů BaP s DNA v plicích myši. Šipka označuje adukt detekovaný metodou  $^{32}\text{P}$ -postlabeling, 10-(deoxyguanosin- $\text{N}^2$ -yl)-7,8,9-trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydro-BaP (dG- $\text{N}^2$ -BPDE).

Cytochromy P450 patří mezi nejdůležitější enzymy, které participují na metabolismu testované cizorodé látky BaP. Je známo, že BaP může sám indukovat expresi těchto enzymů a ovlivnit tak svůj vlastní genotoxický efekt. Proto jsme se v této studii zaměřili na analýzu exprese CYP1A1 a 1B1, enzymů aktivujících BaP, když byl zvířecí model vystaven pouze LPS a/nebo BaP a jak toto působení ovlivňuje jeho metabolismus. Z výsledků je patrné, že indukce proteinu CYP1A1 byla prokázána v plicích myši premedikovaných pouze BaP a v kombinaci s LPS (*Obrázek 22A*).



**Obrázek 22:** Expresce cytochromu P450 1A1 v plicích (A) a játrech (B) myši premedikovaných LPS, BaP a LPS+BaP a kontrolní linie, kterým bylo podáno pouze rozpouštědlo. Jako kontrola množství aplikovaných proteinů byla použita detekce proteinu GAPDH. Překlad anglického názvosloví (liver-játra, lung-plíce).

Nicméně aktivita CYP1A1 ve vzorcích izolovaných z plic myší vystavených kombinaci LPS/BaP byla nižší než u myší vystavených pouze BaP. Zdá se, že vystavení myší působení LPS ovlivňuje aktivitu CYP1A1 v plicích. I když se může zdát, že tyto výsledky jsou v rozporu s výsledky získanými z analýzy aduktů s DNA, již z předchozích studií je známo, že CYP1A1 je *in vivo* důležitější pro detoxifikaci BaP než jeho aktivaci (Arlt et al., 2008, 2012). Proto pokles v aktivitě CYP1A1 v myších premedikovaných LPS/BaP oproti myším vystaveným pouze BaP, vedl k poklesu odbourávání BaP a k navýšení jeho genotoxicity (vznik aduktů s DNA) v plicích. Kromě vlivu LPS na CYP1A1 byl zkoumán vliv i na další enzym participující na metabolismu BaP, CYP1B1. V tomto případě však žádný vliv LPS/BaP na expresi tohoto proteinu zaznamenán nebyl (viz Obrázek 9 v publikaci, která tvoří přílohu č. 4 této disertační práci).

V důsledku snížené detoxifikace BaP v plicích byl zaznamenán až 3,5 krát vyšší obsah aduktů s DNA v játrech myší premedikovaných LPS/BaP než těch, které byly vystaveny působení pouze BaP. Z uvedeného vyplývá, že nejvyšší exprese a aktivita CYP1A1 by měla být ve vzorcích mikrosomů izolovaných z jater myší vystavených kombinaci LPS a BaP. Tento předpoklad byl také potvrzen (Obrázek 22B). Tyto výsledky opět podpořily předpoklad, že CYP1A1 hraje dvojí úlohu v metabolismu BaP *in vivo*, jak detoxifikační tak i aktivační.

Výsledky této studie ukazují, že zánětlivé onemocnění plic může funkčně interagovat s karcinogenními polycyklickými uhlovodíky (např. BaP) a může inhibovat enzymovou aktivitu CYP1A1. To výsledně vede k poškození DNA prostřednictvím zvýšené tvorby aduktů DNA s BaP v plicích. Zánět plic tak může hrát důležitou roli v geno-toxicitě polycyklických aromatických uhlovodíků vázaných na malé částice v cigaretovém kouři, které iniciují tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS) v jednom z analyzovaných orgánů, v plicích.

**Podíl disertantky na prezentované publikaci:** Isolace mikrosomální frakce z orgánů zvířat a stanovení aktivit enzymů. Stanovení exprese proteinů v těchto mikrosomálních frakcích metodou „Western blotting“. Vyhodnocení experimentálních dat a jejich statistické zpracování. Participace na přípravě publikace.

## 5.5 Příprava a využití anti-peptidových protilátek pro detekci orfánových cytochromů P450 – *publikace č. 5*

**Tyto výsledky byly publikovány v časopise *Neuroendocrinology Letters* (příloha č. 5):** Petr Hodek, Johana Hrdinová, Iva Máčová, Pavel Souček, **Iveta Mrízová**, Kamila Burdová, René Kizek, Jiří Hudeček, Marie Stiborová: Preparation and application of anti-peptide antibodies for detection of orphan cytochromes P450. *Neuro Endocrinol. Lett.*, 36 (Suppl. 1) (2015) 101-108.

V další publikované práci, která tvoří součást předkládané disertační práce, jsme se zaměřili na přípravu protilátek pro tzv. „orfánové“ cytochromy P450 (*kapitola 2.4.1.4*), konkrétně pro CYP2S1 a CYP2W1. Imunochemické analýzy ukázaly, že CYP2S1 je exprimován v mnoha lidských nádorech epiteliálního původu, zejména v tkáních vystavených látkám okolního prostředí (Saarikoski et al., 2005). Z toho důvodu byl CYP2S1 navržen jako marker nádorového onemocnění a jako slibný cíl pro imunoterapii. Proto byl hlavní cíl této práce vývoj a příprava protilátek, které by sloužily jako diagnostický nástroj pro imunodetekci těchto CYP v nádorových tkáních. Komentář uvedený v této kapitole disertační práce je zaměřený na přípravu protilátky pro CYP2S1, která je relevantní pro tuto disertační práci. Nicméně výsledky z přípravy protilátek pro CYP2W1 jsou detailně popsány v příložené publikaci (*příloha č. 5*).

Na počátku celého procesu přípravy protilátek bylo nutné zvolit metodu přístupu. V našem případě jsme zvolili tzv. „peptidový přístup“ (z angl. peptide approach), který vychází z návržení a přípravy unikátní peptidové sekvence (alespoň 8 AMK) jako haptenu, který je charakteristický pouze pro konkrétní lidský cytochrom P450. Ten se pak použije k přípravě imunogenu a následné imunizaci. Pro produkci protilátek byl zvolen slepičí organismus, vzhledem k nesporným výhodám takto připravených IgY protilátek (Gassmann et al., 1990; Wolley a Landon, 1995; Carlander et al., 1999).

Na základě dostupné literatury a pomocí molekulárních programů (UniProt, ExPASy, BLAST) pro přípravu imunogenů anti-CYP2S1 byly vybrány dvě různé aminokyselinové sekvence tohoto enzymu (8-15 AMK). Podle vybraných sekvencí byly připraveny syntetické peptidy (*VIDIA, ČR*). Vzhledem k tomu, že uvedené peptidy nebyly dostatečně velké (nízká relativní hmotnost), aby vyvolaly imunitní odpověď, byly následně navázány na proteinový nosič – KLH („keyhol limpet hemocyanin“).

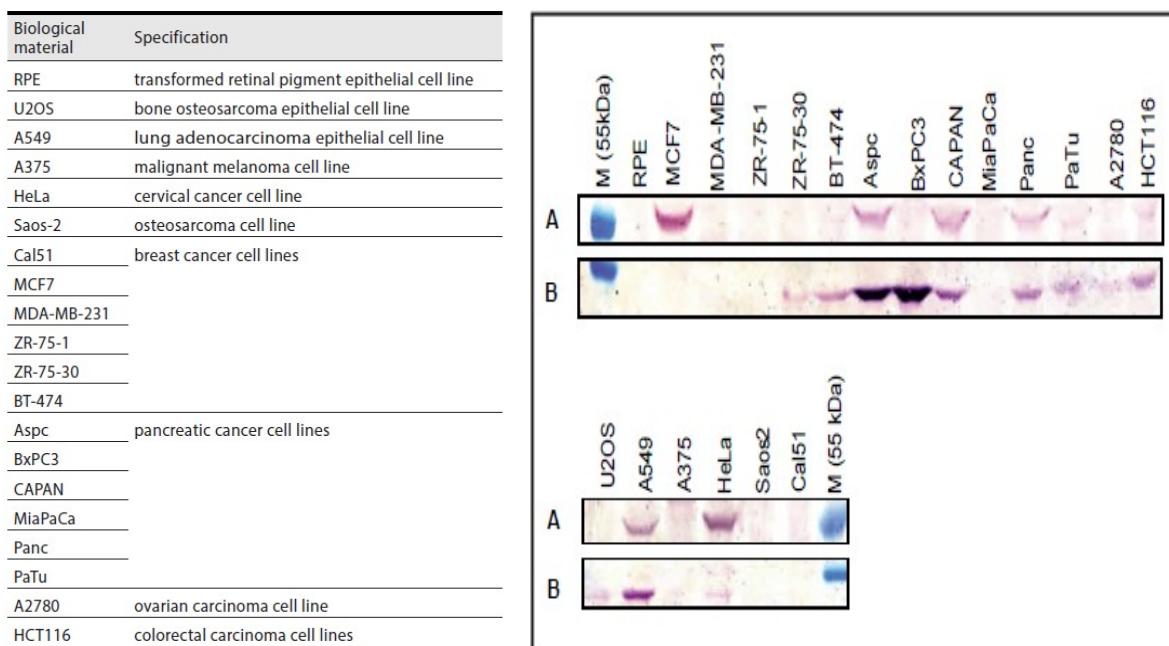
Ze žloutků vajec odebraných před a po imunizaci byly připraveny kontrolní a specifické protilátky. Po izolaci protilátek skládající se z „vymražení“ suspenzí žloutků a následné precipitace pomocí NaCl, byl zjištěn objem protilátkové frakce, u které byla fotometricky při 280 nm stanovena koncentrace proteinů. Produkce protilátek v imunizovaných zvířátech byla několikanásobně vyšší než v kontrolních. Toto zvýšení obsahu IgY je v souladu s hypersensibilitou slepic vůči Freudovu adjuvans a imunitní odpovědi na KHL nosič s navázaným peptidem.

K ověření specifity získaných protilátek byla použita metoda ELISA. Obě izolované protilátky specificky rozpoznávaly peptidový antigen. Nicméně obě protilátky vykazovaly tzv „křížovou“ reaktivitu i s celou řadou dalších epitopů. Za účelem získání specifických protilátek z frakce IgY byly tyto protilátky izolovány afinitní purifikací. Při porovnání IgY frakcí před a po afinitní purifikaci je zřejmé, že anti-peptidová IgY-CYP2S1a a CYP2S1b byla nabohacena 15-35 krát.

Obě afinitně purifikované anti-peptidové IgY proti CYP2S1 byly testovány metodou Western blot na jejich schopnost reagovat s peptidovým epitopem standardu CYP2S1, který byl připraven heterologní expresí v *E. coli* (Mrázová et al., 2016 - příloha č. 7). Obě protilátky reagovaly se standardem CYP2S1 a nevykazovaly „křížovou“ reaktivitu vůči epitopu dalšího enzymu, CYP2W1.

Následně byly tyto antipeptidové protilátky použity pro detekci exprese CYP2S1 v nádorových buněčných liniích a tkáních. Na obrázku 23 jsou znázorněny výsledky těchto experimentů, a to pro CYP2W1 (A) a CYP2S1a protilátku (B), která vykazovala vyšší aviditu k epitopu CYP2S1. Je zajímavé, že přítomnost obou proteinů byla prokázána ve většině pankreatických nádorových buněk (kromě MiaPaCa). Podobně i v buňkách kolorektálního karcinomu (HCT116), adenokarcinomu plic (A549) a nádorových buňkách děložního čípku (HeLa). CYP2S1 byl exprimován jenom ve dvou ze šesti studovaných prsních nádorových linií (ZR-75-30, BT-474). Tento cytochrom P450 byl navíc výhradně exprimován pouze v pankreatické nádorové linii BxPC3. Získané výsledky tak potvrdily již dřívější předpoklady, že CYP2S1 může sloužit jako prognostický marker nejenom pro karcinom pankreatu, ale také některých typů prsního karcinomu (Kumarakulasingham et al., 2005; Murray et al., 2010).

Z dosažených výsledků vyplývá, že získané antipeptidové protilátky jsou vysoce specifické a je možné je použít k imunodetekci cytochromu P450 2S1 (resp. CYP2W1). Takto připravené protilátky mohou sloužit jako diagnostický nástroj pro detekci markerů různých nádorových onemocnění.



**Obrázek 23:** Detekce CYP2W1 (A) a CYP2S1 (B) v nádorových buněčných liniích a tkáních pomocí metody Western blot. Zkratky vzorků buněk jsou vysvětleny v tabulce uvedené vlevo. Molekulový standard s molekulovou hmotností 55 kDa je označen modrou barvou (M).

**Podíl disertantky na prezentované publikaci:** Isolace protilátek z vaječných žloutků a jejich purifikace. Detekce proteinů a ověření reaktivity připravených protilátek metodou Western blot. Vyhodnocení experimentálních dat a jejich statistické zpracování. Participace na přípravě publikace.

## 5.6 Indukce cytochromu b<sub>5</sub> působením ellipticinu, benzo[a]pyrenu a 1-fenylazo-2-naftolu (Sudanu I) v organismu potkana – publikace č. 6

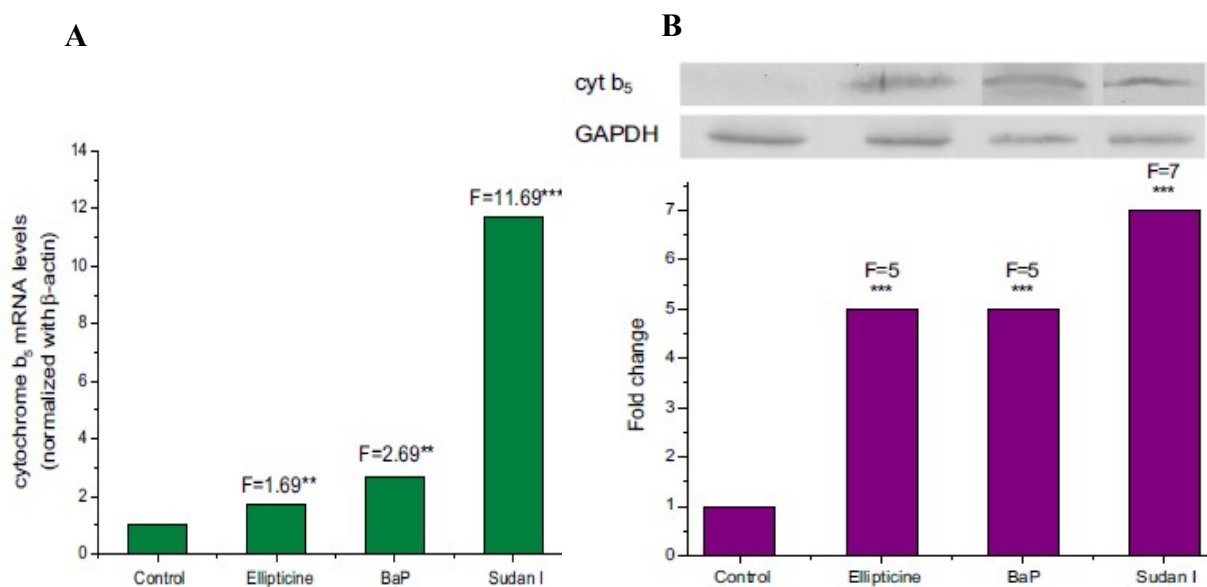
Tyto výsledky byly publikovány v časopise *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* (příloha č. 6): Marie Stiborová, Michaela Moserová, Iveta Mrízová, Helena Dračínská, Václav Martínek, Radek Indra, Eva Frei, Vojtěch Adam, René Kizek, Heinz H. Schmeiser, Kateřina Kubáčková, Volker M. Arlt: Induced expression of microsomal cytochrome b<sub>5</sub> determined at mRNA and protein levels in rats exposed to ellipticine, benzo[a]pyrene, and 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I). *Monatsh. Chem.*, 147 (2016) 897-904

Výsledky, které jsme získali v předešlých pracích (přílohy č. 1-3), ukazují, že cytochrom b<sub>5</sub> hraje důležitou roli v oxidaci ellipticinu *in vitro* a *in vivo*. Proto jsme se v této studii zaměřili na poznání vlivu nejen protinádorového léčiva ellipticinu, ale také dvou dalších látek, karcinogenů benzo[a]pyrenu a 1-fenylazo-2-naftolu (Sudanu I), na expresi cyt b<sub>5</sub> *in vivo*. Kromě toho byl sledován i vliv těchto sloučenin na jejich vlastní metabolismus a vznik aduktů s DNA tvořených z jejich aktivačních metabolitů *in vitro*. Jako modelový organismus byl zvolen model potkana.

Vliv uvedených třech různých xenobiotik byl sledován v játrech, v orgánu, který je hlavním místem metabolismu xenobiotik. Játra jsou dominantním místem exprese enzymů participujících na metabolismu cizorodých látek včetně cytochromů P450 a dalších složek MFO systému (CPR, cytochrom b<sub>5</sub>). Ke sledování exprese mRNA cyt b<sub>5</sub> byla využita metoda RT-PCR a pro stanovení obsahu proteinu cytochromu b<sub>5</sub> byla použita metoda Western blot. Ze získaných výsledků je patrné, že míra exprese mRNA a proteinu cyt b<sub>5</sub> byla působením ellipticinu, BaP a Sudanu I v obou případech několikrát zvýšena (Obrázek 24A). Nejvyšší indukce mRNA i proteinu cyt b<sub>5</sub> byla produkována Sudanem I.

Rozdíly v míře indukce mRNA a proteinu cyt b<sub>5</sub> jednotlivými cizorodými testovanými látkami mohou být způsobeny několika důvody: např. v různém podání testované sloučeniny a/nebo různou indukční schopnost těchto xenobiotik. Vzhledem k tomu, že ellipticin, BaP a Sudan I byly v předchozích studiích prokázány jako silné induktory CYP1A1 na úrovni mRNA a proteinu, byl v experimentech pro cyt b<sub>5</sub> zvolen analogický postup pro podání xenobiotika a jeho stejná dávka. Nejvyšší indukce

CYP1A1 byla totiž zjištěna v játrech potkana vystavených Sudanu I (80x) (Stiborová et al., 2013), následována vystavením BaP (40x) (Hodek et al., 2013b) a ellipticinu (34x) (Aimová et al., 2007). Tyto výsledky ukazují, že tendence indukce CYP1A1 pomocí zkoumaných sloučenin byla podobná jako u cytochromu  $b_5$  v této práci (Obrázek 24B).



**Obrázek 24:** Expresa mRNA (A) a proteinu cytochromu  $b_5$  (B) v játrech potkana. Jako kontrola množství aplikovaných proteinů byla použita detekce proteinu GAPDH. Hodnoty jsou průměry třech měření, a směrodatná odchylka byla menší než 10 %. Hodnoty signifikantně odlišné od kontrol: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (Student's t-test). (F-násobek nárůstu).

Pro analýzu metabolické aktivace všech tří látek byly použity mikrosomy izolované z jater potkanů kontrolních (nepremedikovaných) a vystavených zkoumaným sloučeninám. K analýze a separaci jednotlivých metabolitů byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Ze získaných výsledků je patrné, že oxidace ellipticinu a Sudanu I byla účinnější v případě mikrosomů z premedikovaných zvířat. V případě BaP byla však situace pro některé metabolity odlišná.

Při oxidaci ellipticinu *in vitro* mikrosomy zvířat premedikovaných ellipticinem bylo tvořeno až pět metabolitů: 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxy-, 7-hydroxyellipticin a ellipticin  $N^2$ -oxid což je v souladu s předchozími studiemi (Stiborová et al., 2006; Vranová et al., 2013 - příloha č. 1). Inkubace mikrosomů a Sudanu I vedla ke vzniku 3 metabolitů: 4'-OH-Sudan I, 6-OH-Sudan I a 4',6-OH-Sudan I. Tyto výsledky jsou rovněž ve shodě s dřívějšími poznatky (Stiborová et al., 2002b). V případě BaP vznikalo několik metabolitů tohoto karcinogenu: BaP-4,5-dihydrodiol, BaP-7,8-dihydrodiol, BaP-



9,10-dihydrodiol, BaP-1,6-dion, BaP-3,6-dion, BaP-3-ol, and BaP-9-ol a metabolit s dosud neidentifikovanou strukturou (Mx). Zatímco v případě metabolitů BaP-7,8-dihydrodiolu a BaP-3-olu došlo k nárůstům jejich tvorby mikrosomy zvířat premedikovaných BaP, tak tvorba metabolitů BaP-1,6-dionu, BaP-3,6-dionu, BaP-9-olu byla nižší než v mikrosomech zvířat kontrolních (nepremedikovaných). V této souvislosti je nutné zmínit, že předchozí studie ukázali, že vznik BaP-7,8-dihydrodiolu a BaP-3-olu, v systému obsahujícím potkaní CYP1A1, byl potencován cytochromem b<sub>5</sub> (Indra et al., 2013).

V neposlední řadě byl v této studii sledován vznik aduktů jednotlivých testovaných látek s DNA aktivovaných mikrosomy. Mikrosomy izolované z jater všech premedikovaných zvířat aktivovaly cizorodé látky účinněji než zvířata nepremedikované. Ellipticin byl aktivován za vzniku dvojnásobného množství dvou majoritních aduktů vznikajících z 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu a dvou minoritních aduktů oproti mikrosomům kontrolních zvířat. Mikrosomy izolované ze zvířat premedikovaných Sudanem I byly až 10 krát účinnější ve tvorbě 8-(fenylozo)guaninového aduktu v DNA. V případě BaP vznikaly rovněž dva adukty s DNA označované jako adukty 1 a 2. Vystavení potkaního organismu benzo[a]pyrenu způsobilo až 40 a 15 násobné zvýšení obsahu aduktů s DNA 1 a 2 (v tomto pořadí) v inkubacích s těmito mikrosomy.

Již z předchozích studií (Aimová, et al., 2007; Arlt et al., 2008; Stiborová et al., 2013) je patrné, že všechna tři xenobiotika jsou induktory CYP1A1 v různých organismech včetně potkana. Proto může být indukce CYP1A1 jedním z důvodů odpovědných za zvýšenou oxidaci parentálních molekul xenobiotik a vyšší tvorbu aduktů s DNA. Avšak také indukce cytochromu b<sub>5</sub> může modulovat jejich metabolismus. Kotrbová et al., ve své práci popsala, že exprese cyt b<sub>5</sub> mění profil metabolitů ellipticinu resultujícímu k tvorbě vyšších koncentrací aktivačních metabolitů 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu, které tvoří adukty s DNA (Kotrbová et al., 2011).

I když mechanismus indukce cyt b<sub>5</sub> nebyl v práci objasněn, výsledky uvedené v této publikaci ale i v dalších pracích (Lubet, 1983; Nebert et al., 2004; Aimová et al., 2007; Stiborová et al., 2014) naznačují, že mechanismus indukce tohoto proteinu by mohl být regulován přes Ah receptor, podobně jak je tomu u CYP1A1. Nicméně tato hypotéza musí být v budoucnu dále zkoumána. Ze získaných výsledků je však patrné, že indukce cytochromu b<sub>5</sub> může přispět k efektivnějšímu metabolismu testovaných látek a modulovat jejich bioaktivaci, která je katalyzována cytochromy P450.

**Podíl disertantky na prezentované publikaci:** Isolace mikrosomálních frakcí z orgánů zvířat a stanovení koncentrace proteinů. Stanovení exprese proteinů v těchto mikrosomálních frakcích metodou „Western blotting“. Stanovení obsahu mRNA metodou RT-PCR. Studium oxidačních reakcí s potkaními mikrosomy pomocí HPLC. Vyhodnocení experimentálních dat a jejich statistické zpracování. Participace na přípravě publikace.

### 5.7 Heterologní exprese lidského cytochromu P450 2S1 v *Escherichia coli* a studium jeho úlohy v metabolismu benzo[a]pyrenu a ellipticinu – publikace č. 7

Tyto výsledky byly publikovány v časopise *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* (příloha č. 7): Iveta Mrízová, Michaela Moserová, Jan Milichovský, Miroslav Šulc, René Kizek, Kateřina Kubáčková, Volker M. Arlt, Marie Stiborová: Heterologous expression of human cytochrome P450 2S1 in *Escherichia coli* and investigation of its role in metabolism of benzo[a]pyrene and ellipticine. *Monatsh. Chem.*, 147 (2016) 881-888.

Jak již bylo zmíněno výše, výsledky našich předchozích prací (publikace uvedené jako přílohy č. 1-6) signalizují, že protinádorové léčivo ellipticin a BaP mohou být kromě cytochromů P450, které přijímají elektrony ze systému NADPH a CPR, oxidované také CYP, u kterých není jejich aktivita závislá na CPR. Z dostupných poznatků lze předpokládat, že jedním z těchto enzymů může být cytochrom P450 2S1. Abychom tento předpoklad potvrdili, bylo nutné analyzovat, zda-li jsou obě tyto látky (BaP, ellipticin) substráty CYP2S1. Vzhledem k obtížné izolaci CYP2S1 z přírodního biologického materiálu, připravili jsme tento enzym heterologní expresí.

Cílem experimentů bylo připravit lidskou formu CYP2S1 a poznat jeho úlohu v metabolismu BaP a ellipticinu. K expresi byly použity prokaryotické buňky *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  s genem pro lidskou formu CYP2S1 a byly získány jako dar prof. F. P. Guengeriche (*Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, USA*). Hned v počátcích experimentů se ukázalo, že pro úspěšnou produkci proteinu CYP2S1 bude nutné optimalizovat podmínky exprese tohoto konstruktu (objem kultivačního média, čas a teplota produkce). Při použití 100 ml kultivačního média v 500 ml Erlenmeyerově lahvi bylo dosaženo maximálního výtěžku proteinové produkce (200 nmol/l). Podobně se ukázalo, že i dobu pěstování buněčné kultury bude nutné vzhledem k původnímu protokolu (Wu et al., 2006) upravit. Maximální produkce CYP byla dosažena po 24 hodinách od počátku produkce při teplotě 29 °C. Při vyšší době kultivaci (40 h) však již nedošlo k nárůstu exprimovaného proteinu a dokonce docházelo k degradaci CYP na jeho neaktivní formu P420.

Identita exprimovaného cytochromu P450 2S1 byla potvrzena hmotnostní spektrometrií a jeho čistota a homogenita prokázána metodou Western blot. K té byla použita slepičí anti-peptidová protilátka proti CYP2S1 (příprava protilátky byla popsána v publikaci, která je přílohou č. 5).

K enzymovým studiím je nezbytné, aby byl protein v nativní konformaci a byl aktivní. Pro redukovanou formu cytochromů P450 je charakteristická jejich reakce s molekulou CO, kdy po navázání této molekuly do aktivního centra enzymu, vykazuje absorpční maximum při 450 nm. Cytochrom P450 2S1 po redukcí dithioničtanem draselným a inkubaci s CO, vykazoval absorpční maximum při 451 nm. O vysoké kvalitě připraveného CYP vypovídá i fakt, že v tzv. CO diferenčním spektru tohoto komplexu nebylo zaznamenáno žádné absorpční maximum v oblasti vlnové délky 420 nm (neaktivní forma CYP).

Měření enzymové aktivity CYP2S1 a jeho schopnost metabolizovat BaP, jeho 7,8-dihydrodiolový derivát a protinádorové léčivo ellipticin, bylo analyzováno ve dvou uspořádáních. V prvním byl připraven rekonstituovaný systém CYP s CPR jako přenašečem elektronů v liposomech. Ve druhém byla připravena inkubační směs, kde byl kromě CYP2S1 přítomen  $H_2O_2$  nebo kumoylhydroperoxid. Vzhledem k tomu, že BaP a jeho metabolit BaP-7,8-dihydrodiol byly popsány jako substráty CYP2S1 (Bui a Hankinson, 2009a; Bui et al., 2009b), byly tyto dvě sloučeniny použity jako modelové substráty izolovaného rekombinantního CYP2S1. Za experimentálních podmínek použitých v našich studiích však nebyla prokázána žádná aktivita CYP2S1 vzhledem k BaP jako substrátu. Ani v jednom z použitých uspořádání, nevznikal při katalýze cytochromem P450 2S1 žádný metabolit BaP. Jak se ukázalo, toto zjištění je v souladu s výsledky z laboratoře prof. Guengericha, který rovněž neprokázal, že by BaP byl substrátem CYP2S1 (Wu et al., 2006). Naproti tomu oxidace BaP-7,8-dihydrodiolu připraveným CYP2S1 na jeho polárnější derivát BaP-7,8,9,10-tetrahydrotetrol byla potvrzena. V systému CYP2S1 rekonstituovaném s CPR v liposomech byla však schopnost CYP2S1 oxidovat substrát až o dva řády nižší oproti rekonstituovaným CYP1A1 a CYP1B1, které jsou hlavními enzymy přeměny BaP na jeho polárnější deriváty. Naopak, CYP2S1 v přítomnosti organického peroxidu generoval až 7x vyšší množství BaP-7,8,9,10-tetrahydrotetrolu než CYP2S1 rekonstituovaný s CPR. V těchto peroxidových systémech vykazoval CYP2S1 v podstatě stejnou (a/nebo ještě vyšší) účinnost než analogický systém obsahující CYP1A1 nebo CYP1B1.

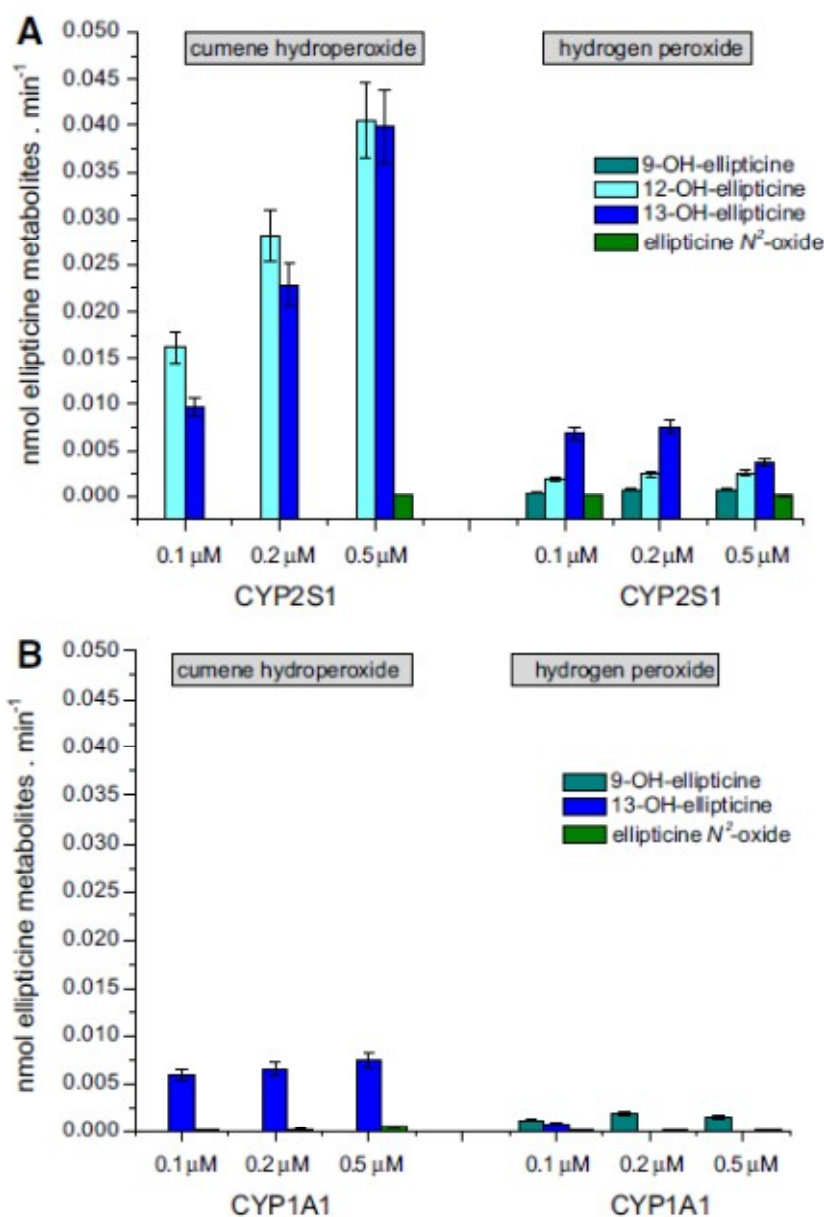
Získané výsledky potvrdily nejenom skutečnost, že CYP2S1, který byl připraven heterologní expresí je enzymově aktivní, ale přinesly také nový poznatek, že účinnost CYP2S1 je vyšší za přítomnosti kumoylhydroperoxidu nebo  $H_2O_2$  než v rekonstituovaném systému s CPR. Z výsledků rovněž vyplývá, že CYP2S1 může zvýšit celkový metabolismus BaP, na kterém se jinak podílí zejména CYP1A1 a CYP1B1 (Baird et al., 2005).

Jako třetí potenciální substrát CYP2S1 bylo vybráno protinádorové léčivo ellipticin. Jak bylo totiž popsáno v dřívějších pracích (Stiborová et al., 2008, 2010, 2015 - *příloha č. 3*), ellipticin může být metabolisován cytochromy P450, které nevyžadují jako donor elektronů NADPH a přenašeč elektronů (dělič elektronového páru) CPR. I v případě ellipticinu byl kromě katalytického účinku CYP2S1 analyzován metabolismus této sloučeniny CYP1A1 za přítomnosti kumoylhydroperoxidu nebo  $H_2O_2$ . Jak bylo popsáno v předchozí publikaci (*příloha č. 1*), CYP1A1 je důležitým enzymem v metabolismu ellipticinu. V této části studie byla sledována schopnost cytochromu P450 1A1 oxidovat ellipticin, a to za absence CPR, pouze v přítomnosti  $H_2O_2$  nebo kumoylhydroperoxidu.

Získaná data ukazují, že CYP2S1 je schopný přeměňovat ellipticin v systému, který obsahuje jako kofaktor peroxidy, tj. systémem nezávislým na NADPH/CPR. Kumoylhydroperoxid byl v tomto experimentu až o jeden řád účinnějším kofaktorem v oxidaci ellipticinu než  $H_2O_2$  (*Obrázek 25A*). CYP2S1 za přítomnosti kumoylhydroperoxidu oxiduje ellipticin především na aktivační metabolity, 12-hydroxyellipticin a 13-hydroxyellipticin. Jak již bylo uvedeno výše, tyto metabolity se podílí na tvorbě dvou hlavních deoxyguanosinových aduktů s DNA (Bořek-Dohalská et al., 2004; Martínková et al., 2009). V reakční směsi s CYP1A1 a peroxidem vodíku nebo kumoylhydroperoxidem vzniklo pouze zanedbatelné množství metabolitů ellipticinu (*Obrázek 25B*). Získané výsledky jsou v souladu s předchozími studiemi (Stiborová et al., 2008, 2010, 2015 – *příloha č. 3*), kde bylo předpokládáno, že na metabolismu ellipticinu se kromě CYP, které spolupracují s NADPH a CPR, mohou podílet i jiné enzymy, které nejsou závislé na CPR. Vedle peroxidas, které byly nalezeny jako enzymy aktivující ellipticin (Stiborová et al., 2007a), je tedy další enzymem, který není závislý na CPR právě CYP2S1.

Výsledky prezentované v uvedené publikaci (Mrízová et al., 2016, *příloha č. 7*) demonstrují, že CYP2S1 v přítomnosti kumoylhydroperoxidu nebo  $H_2O_2$  katalyzuje oxidaci dvou xenobiotik, BaP-7,8-dihydrodiolu a ellipticinu. Navíc byla prokázána

schopnost CYP2S1 metabolisovat ellipticin nezávisle na NADPH:cytochrom P450 reduktase.



**Obrázek 25:** Oxidace ellipticinu lidským rekombinantním CYP2S1 (A) a CYP1A1 (B) s kumoylhydroperoxidem nebo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Hodnoty jsou průměry třech měření ± směrodatná odchylka.

**Podíl disertantky na prezentované publikaci:** Optimalizace podmínek, exprese CYP2S1 v *E. coli* a purifikace proteinu. Stanovení obsahu proteinu a ověření čistoty. Měření enzymových aktivit proteinu. Vyhodnocení experimentálních dat a jejich statistické zpracování. Participace na přípravě publikace.

## **6. Závěr**

Předkládaná disertační práce přináší nové poznatky o úloze systému oxidas se smíšenou funkcí v metabolismu cizorodých látek. Nejdůležitější výsledky získané v práci lze shrnout následovně.

Výsledky získané v disertační práci plně prokazují, že potkaní cytochromy CYP1A1/2 a CYP3A spolu s cytochromem  $b_5$  jsou zodpovědné jak za aktivaci ellipticinu vedoucímu k tvorbě aduktů s DNA, tak také za tvorbu jeho detoxikačních metabolitů *in vivo*. Navíc bylo prokázáno, že množství a aktivita těchto proteinů je indukována samotným ellipticinem. Ze získaných výsledků je patrné, že indukce cytochromu  $b_5$  může přispět k efektivnějšímu metabolismu xenobiotik a modulovat tak jejich biologické vlastnosti, konkrétně ty, které jsou zprostředkovány cytochromy P450. Kromě toho lze předpokládat, že by mechanismus indukce tohoto proteinu mohl být regulován prostřednictvím Ah receptoru, podobně jak je tomu v případě indukce CYP1A1. Nicméně tato hypotéza musí být v budoucnu potvrzena. Ellipticin je schopný indukovat biotransformační enzymy *in vivo*, kde se tyto enzymy podílí na jeho metabolické aktivaci za vzniku aduktů s DNA. Tato indukce probíhá i v nádorových buněčných liniích *in vitro*, kde ellipticin může zvýšit svou vlastní cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám.

Ve studii, která analyzovala, jak zánětlivé onemocnění plic může ovlivnit metabolismus environmentálního karcinogenu benzo[a]pyrenu bylo prokázáno, že toto onemocnění může inhibovat enzymovou aktivitu CYP1A1. To výsledně vede k poškození DNA tvorbou aduktů BaP s DNA v plicích. Zánět plic tak může hrát důležitou roli v genotoxicitě polycyklických aromatických uhlovodíků v plicích.

V předkládané disertační práci byla rovněž optimalizovaná příprava „orfánového“ CYP2S1 a prokázána jeho úloha v metabolismu ellipticinu a BaP-7,8-dihydrodiolu. Navíc byla potvrzena hypotéza, že tento enzym neinteraguje v katalytickém cyklu s NADPH:cytochrom P450 reduktasou a podílí se na oxidaci substrátu tzv. „peroxidasovou reakcí“. Pro detekci tohoto proteinu (CYP2S1) byla v rámci disertační práce připravena anti-peptidová protilátka, která má vysokou afinitu vůči epitopu CYP2S1 a dokáže tento protein rozpoznat i v místech s jeho nižší expresí. Takto připravená protilátka může najít využití jako diagnostický nástroj pro detekci markerů různých nádorových onemocnění.

Součástí předkládané práce je rovněž jedna přehledová publikace, která shrnuje dosavadní výsledky a informace o participaci cytochromů P450 na farmakologickém účinku protinádorového léčiva ellipticinu.



## **7. Seznam použité literatury**

- Aimová D, Svobodová L, Kotrbová V, Mrázová B, Hodek P, Hudeček, J, Václavíková R, Frei E, Stiborová M, (2007): *Drug Metab. Dispos.*, 35, 1926-1934.
- Anari MR, Khan S, Jatoe SD, O'Brien PJ, (1997): *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.*, 22, 305-310.
- Anzenbacher P, Dawson JH, Kitagawa T, (1989): *J. Mol. Struct.* 214, 149-158.
- Arinc E, Schenkman J, Hodgson E, (2013): *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, New York, USA
- Arlt VM, Stiborová M, Henderson CJ, Thiemann M, Frei E, Aimová D, Singh R, Gamboa da Costa G, Schmitz OJ, Farmer PB, Wolf CR, Phillips DH, (2008): *Carcinogenesis* 29, 656–665.
- Arlt VM, Zuo J, Trenz K, Roufosse CA, Lord GM, Nortier JL, Schmeiser HH, Hollstein M, Phillips DH, (2011): *Int. J. Cancer* 128, 21–32.
- Arl VM, Poirier MC, Sykes SE, John K, Moserová M, Stiborová M, Wolf CR, Henderson CJ, Phillips DH, (2012): *Toxicol Lett.* 213, 160–166.
- Arlt VM, Krais AM, Godschalk RW, Rizzo-Vasquez Y, Mrázová I, Roufosse CA, Corbin Ch, Quan S, Frei E, Stiborová M, van Schooten FJ, Phillips DH, Spina D, (2015): *Tox. Sci.*, 146, 213-225.
- Autrup H, Harris CCT, Benjamin F, Jeffrey AM, (1978): *Cancer Res.* 1978, 38, 3689-3696.
- Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B, (2005): *Environ. Mol. Mutagen.* 45, 106–114.
- Barrett JC, Wisemna RW, (1987): *Environ. Health Perspect.* 76, 65-70.
- Bieler CA, Stiborová M, Wiessler M, Cosyns JP, Van Ypersele de Strihou C, Schmeiser HH, (1997): *Carcinogenesis* 18, 1063–1067.
- Bishop JM, (1991): *Cell* 64, 235-248.
- Blake RC, Coon MJ, (1981): *J. Biol. Chem.* 256, 12127–12133.
- Bogaarads JJ, Bertrand M, Jackson P, Oudshoorn MJ, Weaver RJ, van Bladeren PJ, Walther B, (2002): *Xenobiotica* 30:1131-1152.
- Bořek-Dohalská L, Hodek P, Šulc M, Stiborová M, (2001): *Chem.-Biol. Interact.* 138, 85-106.
- Bořek-Dohalská L, Frei E, Stiborová M, (2004): *Collect Czech Chem Commun* 69,603–15.
- Bui PH, Hankinson O, (2009a): *Mol. Pharmacol.* 76, 1031–1043.
- Bui PH, Hsu EL, Hankinson O, (2009b): *Mol. Pharmacol.* 76, 1044–1052.

- Burke MD, Mayer RT, (1974): *Drug Metab. Dispos.* 2, 583–588.
- Burke MD, Thompson S, Weaver RJ, Wolf CR, Mayer RT, (1994): *Biochem. Pharmacol.* 48, 923–936.
- Carlander D, Stalberg J, Larsson A, (1999): *Ups. J. Med. Sci.* 104, 179-89.
- Cogliano VJ, Baan R, Straif K, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Wild ChP, (2011): *J. Natl. Cancer Inst.* 103, 1827 – 1839.
- Coon MJ, Ding X, Pernecky SJ, Vaz ADN, (1992): *FASEB J.*, 6, 669-673.
- Cooper GM, (2000): *The Cell* 2nd edition, *Sinauer Associate*, Boston
- Cornfield J, Haenszel W, Hammond EC, Lilienfeld AM, Shimkin MB, Wynder EL, (2009): *Int. J. Epidemiol.* 38, 1175-1191.
- Cytochrom P450 homepage, <http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html> [cited 2016-03-24]
- Dalton LK, Demerac S, Elmes BC, Loder JW, Swan JM, Teitei T, (1967): *Aust. J. Chem.* 20, 2715-2727.
- Deb S, Bandiera SM, (2010): *Toxicology*, 267, 91–98.
- Degtyarenko KN, Archakov AI, (1993): *FEBS Lett.* 332, 1–8.
- DeMarini DM, Cros S, Paoletti C, Lecoite P, Hsie AW, (1983): *Cancer Res.* 43, 3544-3552.
- DeMarini DM, Aby-Shakra A, Gupta R, Hendee LJ, Levine JG, (1992): *Environ. Mol. Mutagen.* 20, 12-18.
- Denisov IG, Makris TM, Sligar SG, Schlichting I, (2005): *Chem. Rev.* 105, 2253-2277.
- Devi PU, (1998): *Health Adm.* 17:16-24.
- Dickins M, (2004): *Curr. Top. Med. Chem.* 4, 1745–1766.
- Ducassou L, Jonasson G, Dhers L, Pietrancosta N, Ramassamy B, Xu-Li Y, Lorient MA, Beaune P, Bertho G, Lombard M, Mansuy D, André F, Boucher JL, (2015): *Biochim. Biophys. Acta* 1850, 1426–1437.
- Edwards RJ, Murray BP, Singleton AM, Boobis AR, (1991): *Biochemistry*, 30(1), 71-76.
- Ellard S, Mohammed Y, Dogra S, Wolfel C, Doehmer J, Parry JM, (1991): *Mutagenesis* 6, 461–470.
- Enoch HG, Strittmatter P, (1979): *J. Biol. Chem.* 254, 8976–8981.

- Ernster L, (1967): *Methods Enzymol.* 10, 309–317.
- Estabrook RW, Werringloer J, (1978): *Methods Enzymol.* 52, 212-220.
- Fang AH, Smith WA, Vouros P, Gupta RC, (2001): *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 383–389.
- Felsted RL, En-Yuen ChA, Chaykin S, (1973): *J. Biol. Chem.* 278, 2580-2587.
- Frei E, Bieler ChA, Arlt MV, Wiessler M, Stiborová M, (2002): *Biochem. Pharmacol.* 64, 289-295.
- Geacintov NE, Cosman M, Hingerty BE, Amin S, Broyde S, Patel DJ, (1997): *Chem. Res. Toxicol.* 10, 111–146.
- Garner RC, (1998): *Mutat. Res.* 402, 67–75.
- Gassmann M, Thommes P, Weiser T, Hubscher U, (1990): *FASEB J.* 4, 2528-32.
- Gelboin HVP, (1980): *Physiol. Rev.* 60, 1107-1199.
- Gomez A, Nekvindova J, Travica S, Lee MY, Johansson I, Edler D, Mkrtchian S, Ingelman-Sundberg M, (2010): *Mol. Pharmacol.* 78, 1004–1011.
- Guengerich FP, (1991): *J. Biol. Chem.* 266, 10019-10022.
- Guengerich FP, (1997): *Chem. Biol. Interact.* 106:161-182.
- Guengerich FP, (2001): *Chem. Res. Toxicol.* 14, 611-650.
- Guengerich FP, Wu ZL, Bartleson CJ, (2005): *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 465–469.
- Guengerich FP, Tang Z, Salamanca-Pinzón SG, Cheng Q, (2010): *Mol Interv.* 10, 153-163
- Guengerich FP, Cheng Q, (2011): *Pharmacol. Rev.* 63, 684–699.
- Gungor N, Haegens A, Knaapen AM, Godschalk RW, Chiu RK, Wouters EF, van Schooten FJ, (2010a): *Mutagenesis* 25, 77–82.
- Gut I, Souček P, Hodek P, (1992): *Praktický Lékař* 1, 15-20.
- Hecht SS, (2002): *Environ. Mol. Mutagen.* 39, 119–126.
- Heinemann FS, Ozols J, (1983): *J. Biol. Chem.* 258, 4195-4201.
- Hockley SL, Arlt VM, Brewer D, Te Poele R, Workman P, Giddings I, Phillips DH, (2007): *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1797–1810.

- Hodek P, Trefil P, Šimůnek J, Hudeček J, Stiborová M, (2013a): *Int J Electrochem.Sci.* 5, 113–124.
- Hodek P, Koblihová J, Kizek R, Frei E, Arlt VM, Stiborová M, (2013b): *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36, 989-996.
- Holder G, Yagi H, Dansette P, Jerina DM, Levin W, Lu AYH, Conney AH, (1974): *Proc. Nat. Acad. Scie.* 71, 4356-4360.
- Holand T, Riffó-Vasquez Y, Spina D, O'Connor B, Woisin F, Sand C, Marber M, Bacon KB, Rohlf C, Page CP, (2014): *Pulm. Pharmacol. Ther.* 27, 156–163.
- Hollenberg PF, (1992): *FASEB J.* 6, 686-694.
- Hundley SG, Freundenthal RI, (1977): *Cancer research.* 37, 3120-3125.
- Chesis PL, Levin DE, Smith MT, Ernster L, Ames BN, (1984): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 1696-1700.
- Chromá L, Macková M, Martínek V, Stiborová M, (2001): *Chem. Listy*, 95, 212-222.
- IARC <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php> [cited 2016-03-24]
- IARC (2012): *Monogr. Eval. Carcinog. Risk. Chem. Hum.* 100 F
- Indra R, Moserová M, Šulc M, Frei E, Stiborová M, (2013): *Neuro Endocrinol. Lett.* 34 (Supl 2), 55-63.
- Invitrogen PeptideSelect™ (<http://rnaidesigner.lifetechnologies.com/peptide/design.do>) [cited 2016-03-24]
- Ioannides C, Parke DV, (1987): *Biochem. Pharmacol.* 36, 4197–4207.
- Irigaray P, Belpomme D, (2010): *Carcinogenesis*, 31, 135–148.
- Karlgren M, Miura S, Ingelman-Sundberg M, (2005): *Toxicol. Appl. Pharm.* 207, 57-61.
- Kasper CB, (1971): *J. Biol. Chem.* 246, 577-581.
- Kawato S, Gut J, Cherry RJ, Winterhalter KH, Richter C, (1982): *J. Biol. Chem.* 257, 7023–7029.
- Khambete N, Kumar R, (2014): *Int. J. Nutr. Pharmacol. Neurol. Dis.* 4, 4-10.
- Kim J, Stansbury KH, Walker NJ, Trush MA, Strickland PT, Sutter TR, (1998): *Carcinogenesis*, 19, 1847-1853.
- King RJB, Robins MW, (2006): *Cancer Biology* 3rd edition, Benjamin Cummings, USA
- Klener P, (1996): *Protinádorová chemoterapie*, Galén, Praha

- Klener P, (2002): *Klinická onkologie*, Galén, Praha
- Knejzlík Z, Káš J, Ruml T, (2000): *Chem. Listy* 94, 913-918.
- Kotrbová V, Mrázová B, Moserová M, Martínek V, Hodek P, Hudeček J, Frei E, Stiborová M, (2011): *Biochem. Pharmacol.* 82, 669–680.
- Kumar S, (2015): *BMC Research Notes.* 8, 336–340.
- Kumarakulasingham M, Rooney PH, Dundas SR, Telfer C, Melvin WT, Curran S, Murray GI, (2005): *Clin. Cancer Res.* 11, 3758–3765.
- Langie SA, Knaapen AM, Brauers KJ, van Berlo D, van Schooten FJ, Godschalk RW, (2006): *Mutagenesis* 21, 153–158.
- Lemieux CL, Douglá, GR, Gingerich J, Phonethepswath S, Torous DK, Dertinger SD, Phillips DH, Arlt VM, White PA, (2011): *Environ. Mol. Mutagen.* 52, 756–765.
- Le Pecq JB, Nguyen Dat X, Gosse C, Paoletti C, (1974): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 7, 5078-5082.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J, (2000): *Molecular Cell Biology*. 4th edition, *W. H. Freeman and Company*, New York, USA
- Loeb LA, (1989): *Cancer Res.* 49, 5489–96.
- Loeb LA, Harris CC, (2008): *Cancer Res.* 68, 6863-6872.
- Lu G, Lindqvist Y, Schneider G, Dwivedi U, Campbell W, (1995): *J. Mol. Biol.* 248, 931-948.
- Lubet RA, Connolly G, Kouri RE, Nebert DW, Bigelow SW, (1983): *Biochem. Pharmacol.* 32, 3053-3058.
- Luch A, Baird WM, (2005): *Imperial College Press London*, 19–96.
- Martignoni M, Groothuis GMM, de Kanter R, (2006): *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2, 875-894.
- Martinková E, Dontenwill M, Frei E, Stiborová M, (2009): *Neuro Endocrinol. Lett.* 30, (Suppl. 1) 60-66.
- Mathé G, Triana K, Pontiggia P, Blanquet D, Hallard M, Morette C, (1998): *Biomed. Pharmacother.* 52, 391-396.
- Mathews FS, (1985): *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 45, 1-56.
- Mei N, Arlt VM, Phillips DH, Heflich RH, Chen T, (2006): *Mutat. Res.* 602, 83–91.

- Milichovský J, Bárta F, Schmeisser HH, Arlt VM, Frei E, Stiborová M, Martínek V, (2016): *Int. J. Mol. Sci.* 17, 213.
- Mizerovská J, Dračínská H, Frei E, Schmeiser HH, Arlt VM, Stiborová M, (2011): *Mutat. Res.* 720, 34–41.
- Morel Y, Barouki R, (1999): *Biochem. J.* 342, 481–496.
- Moriya N, Kataoka H, Fujino H, Nishikawa J, Kugawa F, (2012): *Biol. Pharm. Bull.* 35, 473–480.
- Moserová M, Kotrbová V, Aimová D, Šulc M, Frei E, Stiborová M, (2009): *Interdiscip. Toxicol.* 2, 239–244.
- Mrázová I, Moserová M, Milichovský J, Šulc M, Kizek R, Kubáčková K, Arlt VM, Stiborová M, (2016): *Monatsh. Chem.* 147, 881–888.
- Multon E, Riou J, LeFevre D, Ahomadegbe J, Riou G, (1989): *Biochem. Pharmacol.*, 38, 2077–2086.
- Munro AW, Girvan HM, McLean KJ, (2007): *Nat. Prod. Rep.* 24, 585–609.
- Murakami K, Mason HS, (1967): *J. Biol. Chem.* 242, 1102–1110.
- Murray GI, Patimalla S, Stewart KN, Miller ID, Heys SD, (2010): *Histopathology* 57: 202–211.
- Nebert DW, Gonzalez FJ, (1987): *Annu. Rev. Biochem.* 56, 945–993.
- Nebert DW, (1989a): *Crit. Rev. Toxicol.* 20, 153–174.
- Nebert DW, Nelson DR, Feyereisen R, (1989b): *Xenobiotica* 19, 1149–1160.
- Nebert DW, Nelson DR, Coom MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, (1991): *Cell Biol.* 10, 1–14
- Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ, (2004): *J. Biol. Chem.* 279, 23847–23850.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW, (1996): *Pharmacogenetics* 6, 1–42.
- Nishida CR, Lee M, Ortiz de Montellano PR, (2010): *Mol. Pharmacol.* 78, 497–502.
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB), (1991): *Eur. J. Biochem.* 200, 599–611.
- Ohashi M, Sugikawa E, Nakanishi N, (1995): *Jpn J. Cancer Res.*, 86, 819–827.

- Oliveira PA, Colaco A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De La Cruz PFL, Lopes C, (2007): *An. Acad. Bras. Ciênc.* 79, 593-616.
- Omura T, Sato R, (1964): *J. Biol. Chem.* 239, 2379–2385.
- Ortiz de Montellano PR, De Voss JJ, (2005): *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, New York, USA
- Park JH, Mangal D, Frey AJ, Harvey RG, Blair IA, Penning TM, (2009): *J. Biol. Chem.* 284, 29725–29734.
- Pierotti MA, Sozzi G, Croce CM, (2003): *Holland-Frei Cancer Medicine* 6th edition. *BC Decker*, USA
- Phillips DH, (1999): *Mutat. Res.* 443, 139–147.
- Phillips DH, (2002): *Carcinogenesis* 23, 1979–2004.
- Phillips DH, (2005): *Imperial College Press, London*, 137–169.
- Phillip DH, Arlt VM, (2007): *Nat. Protoc.* 2, 2772–2781.
- Poirier MC, Santella RM, Weston A, (2000): *Carcinogenesis*, 21, 353-359.
- Poirier MC, (2004): *Nat. Rev. Cancer* 4, 630-637.
- Poljaková J, Stiborová M, (2004): *Chem. Listy* 98, 298
- Poljaková J, Šulc M, Frei E, Stiborová M, (2005): *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky, Olomouc*, 149, 449-453.
- Poljaková J, Frei E, Gomez EJ, Aimová D, Eckschlager T, Hraběta J, Stiborová M, (2007): *Cancer Lett.* 252, 270–279.
- Poljaková J, Eckschlager T, Hraběta J, Hřebáčková J, Smutný S, Frei E, Martínek V, Kizek R, Stiborová M, (2009): *Biochem. Pharmacol.* 77, 1466-1479.
- Poljaková J, Hřebáčková J, Dvořáková M, Moserová M, Eckschlager T, Hraběta J, Göttlicherová M, Kopejtková B, Frei E, Kizek R, Stiborová M, (2011): *Neuro Endocrinol. Lett.* 32, (Suppl. 1) 101-116.
- Poljaková J, Eckschlager T, Kizek R, Frei E, Stiborová M, (2013): *Int. J. Electrochem. Sci.* 8, 1573-1585.
- Porter TD, (2002): *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 16, 311-316.
- Pool-Zobel B, Veeriah S, Bohmer FD, (2005): *Mutat. Res.* 591, 74–92.
- Rivera SP, Saarikoski ST, Hankinson O, (2002): *Mol. Pharmacol.* 61, 255–259.



- Rouësse JG, Le Chevalier T, Caille P, Mondesir JM, Sancho-Garnier H, May-Levin F, Spielmann M, De Jager R, Amiel JL, (1985): *Cancer Treat. Rep.* 69, 707-708.
- Ruddon RW, (2007): *Cancer Biology* 4th edition, *Oxford University Press*, USA
- Rylander T, Neve EPA, Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, (2001): *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 529–535.
- Saarikoski ST, Saitiala T, Holmila R, Impivaara O, Jarvisalo J, Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, (2004): *Mutat. Res.* 554, 267–277.
- Saarikoski ST, Rivera SP, Hankinson O, Husgafvel-Pursiainen K, (2005): *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 62–69.
- Scott RE, Wille JJ, Wier ML, (1984): *Mayo Clin. Proc.* 59, 107-117.
- Seliskar M, Rozman D, (2007): *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 458–466.
- Shen AL, Porter TD, Wilson TE, Kasper CB, (1989): *J. Biol. Chem.* 264, 7584–7589.
- Shen AL, Kasper CB, (1993): *Handbook of Experimental Pharmacology*, *Springer-Verlag Inc*, New York
- Sheweita SA, (2000): *Curr. Drug Metab.* 1, 107–132.
- Schacter BA, Nelson EB, Marver HS, Masters BSS, (1972): *J. Biol. Chem.* 247, 3601–3607.
- Schawaller M, Allard B, Lescot E, Moreau F, (1995): *J. Biol. Chem.* 270, 22709–22713.
- Schenkman JB, Jansson I, (2003): *Pharmacol. Ther.* 97, 139–152.
- Schwab M, (2001): *Encyclopedic Reference of Cancer*, *Springer Science & Business Media*, Berlin, Germany
- Smith G, Wolf CR, Deeni YY, Dawe RS, Evans AT, Comrie MM, Ferguson J, Ibbotson SH, (2003): *The Lancet* 361, 1336-1343.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC, (1985): *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
- Sottocasa GL, Kuylenskierna B, Ernster L, Bergstrand A, (1967): *J. Cell Biol.* 32,415-438.
- Souček P, Gut I, (1993): *Cas. Lek. Cesk.* 132, 353–358.
- Stark K, Guengerich FP, (2007): *Drug Metab. Rev.* 39, 627-637.
- Stiborová M, Frei E, Bieler ChA, Schmeiser HH, (1998): *Chem. Listy*, 92, 661-668.
- Stiborová M, Mikšanová M, (1999a): *Živa*, 4 146-149.

- Stiborová M, Hudeček J, Hodek P, Frei E, (1999b): *Chem. Listy*, 93, 229-237.
- Stiborová M, Bieler AC, Wiessler M, Frei E, (2001a): *Biochem. Pharmacol.* 62, 1675–1684.
- Stiborová M, Frei E, (2001b): *Chem. Listy*, 95, 549-555.
- Stiborová M, (2002a): *Chem. Listy* 96, 784-791.
- Stiborová M, Martinek V, Rýdlový H, Hodek P, Frei E, (2002b): *Cancer Res* 62, 5678-5684.
- Stiborová M, Breuer A, Aimová D, Stiborová-Rupertová M, Wiessler M, Frei E, (2003a): *Int. J. Cancer*, 107, 885–890.
- Stiborová M, Stiborová-Rupertová M, Bořek-Dohalská L, Wiessler M, Frei E, (2003b): *Chem. Res. Toxicol.* 16, 38-47.
- Stiborová M, Sejbál J, Bořek-Dohalská L, Aimová D, Poljaková J, Forsterová K, Rupertová M, Wiesner J, Hudeček J, Wiessler M, Frei E, (2004a): *Cancer Res*, 64, 8374-8380
- Stiborová M, Hudeček J, Páca J, Martinek V, Páca J. (2004b): *Chem. Listy* 98, 876 –890.
- Stiborová M, Bořek-Dohalská L, Aimová D, Kotrbová V, Kukačková K, Janouchová K, Rupertová M, Ryšlavá H, Hudeček J, Frei E, (2006): *Gen. Physiol. Biophys.* 25, 245-261.
- Stiborová M, Poljaková J, Ryšlavá H, Dračinský M, Eckschlager T, Frei E, (2007a): *Int. J. Cancer* 120, 243–251.
- Stiborová M, Rupertová M, Aimová D, Ryšlavá H, Frei E, (2007b): *Toxicology*, 236, 50–60.
- Stiborová M, Arlt VM, Henderson JC, Wolf RC, Kotrbová V, Moserová M, Hudeček J, Phillips DH, Frei E, (2008): *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 226, 318–327.
- Stiborová M, Moserová M, Mrázová B, Kotrbová V, Frei E, (2010): *Neuro Endocrinol. Lett.* 31(Suppl 2), 26-35.
- Stiborová M, (2011a): Biochemie chemické karcinogeneze, *přednáška na PřF UK*, Praha
- Stiborová M, (2011b): Xenobiochemie, *přednáška na PřF UK*, Praha
- Stiborová M, Indra R, Moserová M, Černá V, Rupertová M, Martinek V, Eckschlager T, Kizek R, Frei E, (2012): *Chem. Res. Toxicol.*, 25, 1075-1085.
- Stiborová M, Dračinská H, Martinek V, Svášková D, Hodek P, Milichovský J, Hejduková Ž, Brotánek J, Schmeiser HH, Frei E, (2013): *Chem. Res. Toxicol.* 26, 290-299.

- Stiborová M, Moserová M, Černá V, Indra R, Dračinský M, Šulc M, Henderson CJ, Wolf CR, Schmeiser HH, Phillips DH, Frei E, Arlt VM, (2014): *Toxicology* 318, 1–12.
- Stiborová M, Černá V, Moserová M, Mrízová I, Arlt VM, Frei E, (2015): *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 284-306.
- Stratil P, Kubáň V, (2004): *Chem. Listy*, 98, 379-387.
- Strittmatter P, Velick SF, (1956): *J. Biol. Chem.* 221, 253.
- Strittmatter P, Hackett CS, Korza G, Ozols J, (1990): *J. Biol. Chem.* 265, 21709-21713.
- Sundberg MI, (2005): *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 52-56.
- Tamburini PP, Schenkman JB, (1986): *Mol Pharmacol*, 30(2), 178-185.
- Tewey KM, Chen LG, Nelson ME, Liu FL, (1984): *J. Biol. Chem.* 259, 9182-9187.
- U.S. EPA (2013): *U.S. Environmental Protection Agency*, Washington DC, USA  
[https://cfpub.epa.gov/ncea/iris\\_drafts/recordisplay.cfm?deid=258856](https://cfpub.epa.gov/ncea/iris_drafts/recordisplay.cfm?deid=258856) [cited 2016-03-24]
- Vergeres G, Waskell L, (1995a): *Biochimie*, 77, 604-620.
- Vergeres G, Ramsden J, Waskell L, (1995b): *J. Biol. Chem.* 270, 3414-3422.
- Von Jagow G, Sebald W, (1980): *Annu. Rev. Biochem.* 49, 281-314.
- Wang M, Roberts DL, Paschke R, Shea TM, Masters BS, Kim JJ, (1997): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8411-8416.
- Wang SL, He XY, Hong JY, (2005): *Drug Metab. Dispos.* 33, 336–340.
- Weinberg RA, (1995): *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 758, 331-338.
- Weinstein B, (1988): *Cancer Res.* 48, 4135-4143.
- Weisburger JH, Grantham PH, Vanhorn EC, Steigbigel NH, Rall DP, Weisburger EK, (1964): *Cancer Res.* 24, 475–479.
- Werck-Reichhart D, Feyereisen R, (2000): *Genome Biology*, 1, 1-9.
- White RE, Coon MJ, (1980): *Annu. Rev. Biochem.* 49, 315–356.
- Wogan, (2004): *Sem. Cancer Biol.* 1, 473–486.
- Woolley JA, Landon J, (1995): *J. Immunol. Methods* 178, 253-265.
- Wu ZL, Sohl ChD, Shimada T, Guengerich FP, (2006): *Mol. Pharmacol.* 69, 2007–2014.

Yamazaki H, Johnson WW, Ueng YF, Shimada T, Guengerich FP, (1996): *J. Biol. Chem.* 271, 27438-27444.

Yang SK, Roller PP, Gelboin HV, (1977): *Biochemistry* 16, 3680-3687.

Xu Ch, Yong-Tao Li Ch, Kong AT, (2005): *Arch. Pharm. Res.* 28, 249-268.

## **8. Přílohy**

## ***Příloha 1***

**Iveta Vranová, Michaela Moserová, Petr Hodek, René Kizek, Eva Frei, Marie Stiborová**

**THE ANTICANCER DRUG ELLIPTICINE INDUCES CYTOCHROMES P450 1A1,  
1A2 AND 3A, CYTOCHROME B<sub>5</sub> AND NADPH:CYTOCHROME P450  
OXIDOREDUCTASE IN RAT LIVER, KIDNEY AND LUNG**

*Int. J. Electrochem. Sci.* 8, 1586-1597, 2013

IF<sub>2013</sub> = 1.956

## ***Příloha 2***

Marie Stiborová, Jitka Poljaková, **Iveta Mrízová**, Lucie Bořek-Dohalská, Tomáš  
Eckschlager, Vojtěch Adam, René Kizek, Eva Frei

**EXPRESSION LEVELS OF ENZYMES METABOLIZING AN ANTICANCER DRUG  
ELLIPTICINE DETERMINED BY ELECTROMIGRATION ASSAYS INFLUENCE  
CYTOTOXICITY TO CANCER CELL – A COMPARATIVE STUDY**

*Int. J. Electrochem. Sci.* 9, 5675-5689, 2014

IF<sub>2014</sub> = 1.5

### ***Příloha 3***

Marie Stiborová, Věra Černá, Michaela Moserová, **Iveta Mrízová**, Volker M. Arlt, Eva Frei

**THE ANTICANCER DRUG ELLIPTICINE ACTIVATED WITH CYTOCHROME  
P450 MEDIATES DNA DAMAGE DERMINING ITS PHARMACOLOGICAL  
EFFICIENCIES: STUDIES WITH RATS, HEPATIC CYTOCHROME P450  
REDUCTASE NULL (HRN<sup>TM</sup>) MICE AND PURE ENZYMES**

*Int. J. Mol. Sci.* 16, 284-306, 2015

IF<sub>2014</sub> = 2.862



## ***Příloha 4***

Volker M. Arlt, Annette M. Kraus, Roger W. Godschalk, Yanira Riffó-Vasquez, **Iveta Mrízová**, Candice A. Roufosse, Charmaine Corbin, Shi Quan, Eva Frei, Marie Stiborová, Frederik-Jan van Schooten, David H. Phillips, Domenico Spina

**PULMONARY INFLAMMATION IMPACTS ON CYP1A1-MEDIATED  
RESPIRATORY TRACT DNA DAMAGE INDUCED BY THE CARCINOGENIC AIR  
POLLUTANT BENZO[A]PYRENE**

*Tox. Sci.* 146, 213-225, 2015

IF<sub>2014</sub> = 3.854

## ***Příloha 5***

Petr Hodek, Johana Hrdinová, Iva Mácová, Pavel Souček, **Iveta Mrízová**, Kamila Burdová,  
René Kizek, Jiří Hudeček, Marie Stiborová

### **PREPARATION AND APPLICATION OF ANTI-PEPTIDE ANTIBODIES FOR DETECTION OF ORPHAN CYTOCHROMES P450**

*Neuro Endocrinol. Lett.* 36 (Suppl. 1), 101-108, 2015

IF<sub>2014</sub> = 0.799

## ***Příloha 6***

Marie Stiborová, Michaela Moserová, **Iveta Mrízová**, Helena Dračínská, Václav Martínek,  
Radek Indra, Eva Frei, Vojtěch Adam, René Kizek, Heinz H. Schmeiser, Kateřina  
Kubáčková, Volker M. Arlt

**INDUCED EXPRESSION OF MICROSOMAL CYTOCHROME B<sub>5</sub> DETERMINED  
AT mRNA AND PROTEIN LEVELS IN RATS EXPOSED TO ELLIPTICINE,  
BENZO[A]PYRENE, AND 1-PHENYLAZO-2-NAPHTOL (SUDAN I)**

*Monatsh. Chem.* 147, 897-904, 2016

IF<sub>2014</sub> = 1.222

## ***Příloha 7***

**Iveta Mrízová**, Michaela Moserová, Jan Milichovský, Miroslav Šulc, René Kizek, Kateřina Kubáčková, Volker M. Arlt, Marie Stiborová

**HETEROLOGOUS EXPRESSION OF HUMAN CYTOCHROME P450 2S1 IN  
*ESCHERICHIA COLI* AND INVESTIGATION OF ITS ROLE IN METABOLISM OF  
BENZO[A]PYRENE AND ELLIPTICINE**

*Monatsh. Chem.* 147, 881–888, 2016

IF<sub>2014</sub> = 1.222